

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-503617

(43) 公表日 平成8年(1996)4月23日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A		
A 6 1 K 39/395	A B A		
	A B E D	9284-4C	
	A B S Y	9284-4C	
		9281-4B	
		C 1 2 N 15/00	Z N A A
	審査請求	未請求	予備審査請求 有 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-513460
(86) (22) 出願日	平成5年(1993)11月30日
(85) 翻訳文提出日	平成7年(1995)6月1日
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 3 / 1 1 6 1 2
(87) 国際公開番号	W O 9 4 / 1 2 2 1 5
(87) 国際公開日	平成6年(1994)6月9日
(31) 優先権主張番号	0 7 / 9 8 3 , 9 4 6
(32) 優先日	1992年12月1日
(33) 優先権主張国	米国 (U S)

(71) 出願人	プロテイン デザイン ラブズ、インコーポレーテッド アメリカ合衆国、カリフォルニア州 94043、マウンテン ビュー ガルシア アヴェニュー 2375
(72) 発明者	コー、マン、サン アメリカ合衆国、カリフォルニア州 95014、カパーティノ、ヨシノ プレイス 10230
(74) 代理人	弁理士 松井 光夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 L-セレクトインに反応性のヒト化抗体

(57) 【要約】

L-セレクトインに特異的に反応するヒト化免疫グロブリンが、例えば、炎症性疾患の治療における使用のために組み換えDNA技術を用いて調製される。

Applicants: David J. Pinsky et al.
Serial No.: 10/679,135
Filed: October 3, 2003
Exhibit 15

【特許請求の範囲】

1. 供与体免疫グロブリンからの相補性決定領域（CDR）に対応するCDR及びヒト受容体免疫グロブリン重鎖及び軽鎖フレームワークに対応する重鎖及び軽鎖可変領域フレームワークを有し、かつ、少なくとも $10^7 M^{-1}$ の親和性定数をもってヒトL-セレクトインに特異的に結合するヒト化免疫グロブリンであって、ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列が、供与体免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの配列に対して65%以上の相同性であるヒト化免疫グロブリン。
2. 抗体が2つの軽鎖／重鎖ダイマーを含む請求の範囲第1項記載のヒト化免疫グロブリン。
3. 該抗体がIgG1又はIgG4イソタイプである請求の範囲第2項記載のヒト化免疫グロブリン。
4. 少なくとも $10^8 M^{-1}$ の親和性でヒトL-セレクトインに特異的に結合する請求の範囲第1項記載のヒト化免疫グロブリン。
5. 該供与体免疫グロブリンがマウスDREG-200抗体である請求の範囲第1項記載のヒト化免疫グロブリン。
6. 該受容体免疫グロブリン重鎖及び軽鎖フレームワークが同一のヒト抗体からのものである請求の範囲第1項記載のヒト化免疫グロブリン。
7. 該ヒト抗体がEuヒト抗体である請求の範囲第6項記載のヒト化免疫グロブリン。
8. 供与体免疫グロブリンからの相補性決定領域（CDR）に対応するCDR及び受容体免疫グロブリン重鎖及び軽鎖フレームワークに対応する重鎖及び軽鎖可変領域フレームワークを有し、かつ、少なくとも $10^7 M^{-1}$ の親和性定数をもってヒトL-セレクトインに特異的に結合するヒト化免疫グロブリンであって、受容体免疫グロブリン重鎖可変領域の配列が、供与体免疫グロブリン重鎖可変領域の配列に最も相同であるヒト免疫グロブリン重鎖可変領域の配列の代表的なコレクション（collection）中の5配列のうちの一つであるヒト化免疫グロブリン。

9. 供与体免疫グロブリンからの相補性決定領域 (CDR) に対応する CDR 及び受容体免疫グロブリン重鎖及び軽鎖フレームワークに対応する重鎖及び軽鎖可変領域フレームワークを有し、かつ、少なくとも $10^7 M^{-1}$ の親和性定数をもってヒト L-セレクトインに特異的に結合するヒト化免疫グロブリンであって、該ヒト化免疫グロブリンが、受容体免疫グロブリン重鎖又は軽鎖フレームワーク中の対応す

るアミノ酸を置き換える、供与体免疫グロブリンフレームワークからのアミノ酸を含み、該アミノ酸が重鎖の 26-30 の位置になく、かつ、該アミノ酸のそれぞれが、

(1) 供与体免疫グロブリン配列中の CDR に近接している、又は

(2) 該ヒト化免疫グロブリン中の CDR から 5 オングストローム以内の距離にある原子を含む、

ことを特徴とするヒト化免疫グロブリン。

10. 供与体免疫グロブリンからの相補性決定領域 (CDR) に対応する CDR 及び受容体免疫グロブリン重鎖及び軽鎖フレームワークに対応する重鎖及び軽鎖可変領域フレームワークを有し、かつ、少なくとも $10^7 M^{-1}$ の親和性定数をもってヒト L-セレクトインに特異的に結合するヒト化免疫グロブリンであって、該ヒト化免疫グロブリンが、受容体免疫グロブリン重鎖又は軽鎖フレームワーク中の対応するアミノ酸を置き換える、供与体免疫グロブリンフレームワークからのアミノ酸を含み、該アミノ酸が重鎖の 26-30 の位置になく、かつ、該アミノ酸のそれぞれが、

(1) 供与体免疫グロブリン配列中の CDR に近接している、又は

(2) 該ヒト化免疫グロブリン中の CDR から 4 オングストローム以内の距離にある原子を含む、

ことを特徴とするヒト化免疫グロブリン。

11. 該原子から該 CDR までの距離がコンピューターで作製した免疫グロブリンのモデルから決定される、請求の範囲第 9 項又は第 10 項に記載のヒト化免疫

グロブリン。

12. 該供与体免疫グロブリンがマウスDREG-200抗体である、請求の範囲第9項又は第10項に記載のヒト化免疫グロブリン。

13. 2つの軽鎖／重鎖ダイマーを含む抗体である請求の範囲第9項記載のヒト化免疫グロブリン。

14. 該抗体がIgG1又はIgG4イソタイプである請求の範囲第13項記載ヒト化免疫グロブリン。

15. 該受容体免疫グロブリン重鎖及び軽鎖フレームワークが共にEuヒト抗体からのものである、請求の範囲第9項記載のヒト化免疫グロブリン。

16. 実質的に純粋である請求の範囲第1項又は第9項に記載のヒト化免疫グロブリン。

17. ヒト好中球のヒト内皮細胞への結合を阻害する請求の範囲第1項又は第9項に記載のヒト化免疫グロブリン。

18. 請求の範囲第1項又は第9項に記載のヒト化免疫グ

ロブリンを含む組成物。

19. ヒトL-セ렉チンに特異的に結合する組み換え免疫グロブリンであって、成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列が図2Aの下段に示されたものである組み換え免疫グロブリン。

20. ヒトL-セ렉チンに特異的に結合する組み換え免疫グロブリンであって、成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列が図2Bの下段に示されたものである組み換え免疫グロブリン。

21. ヒト患者にヒトL-セ렉チンに特異的に結合するヒト化免疫グロブリンの治療的有効投与量を投与することを含む、炎症性疾患又は状態の治療方法。

22. 炎症性疾患又は状態が、虚血－再灌流損傷、成人呼吸促進症候群、敗血症及び自己免疫疾患から成る群より選ばれる、請求の範囲第21項記載の方法。

23. ヒト化免疫グロブリンが、図2Aの下段に示された成熟軽鎖可変領域のアミノ酸配列及び図2Bの下段に示された成熟重鎖可変領域のアミノ酸配列を含む、請求の範囲第21項記載の方法。

24. ヒト化免疫グロブリンが少なくとも $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ の親和性でヒトL-セレクトリンに結合する請求の範囲第21項記載の方法。

25. 少なくとも10mgのヒト化免疫グロブリンを非経口経路で投与する請求の範囲第24項記載の方法。

26. 炎症性疾患又は状態が虚血-再灌流損傷である請求の範囲第22項記載の方法。

27. 更に血栓溶解剤の治療的有効投与量を投与する段階を含む請求の範囲第26項記載の方法。

28. 虚血-再灌流損傷が心筋梗塞又はバルーン血管形成による請求の範囲第27項記載の方法。

29. 以下のヒト化重鎖及びヒト化軽鎖を含む請求の範囲第1項記載のヒト化免疫グロブリン

(1) マウスDREG-200免疫グロブリン軽鎖の対応する相補性決定領域からのアミノ酸配列を有し、かつ、L87, L54, L66, L76及びL93からなる第一のグループから選ばれる少なくとも一つの位置を除いてヒト軽鎖可変領域フレームワーク配列からの可変領域フレームワークを有する（ここで、該アミノ酸位置は、マウスDREG-200免疫グロブリン軽鎖可変領域フレームワーク

の等価の位置に存在するそのアミノ酸によって占められている）3つの相補性決定領域（CDR1、CDR2及びCDR3）を含むヒト化軽鎖、及び

(2) マウスDREG-200免疫グロブリン重鎖の対応する相補性決定領域からのアミノ酸配列を有し、かつ、H93, H95, H98, H111, H112, H115, H30, H98, H111, H27, H30, H48及びH72からなるグループから選ばれる少なくとも一つの位置を除いてヒト重鎖可変領域フレームワーク配列からの可変領域フレームワークを有する（ここで、該アミノ酸位置は、マウスDREG-200免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークの等価の位置に存在するそのアミノ酸によって占められている）3つの相補性決定領域（CDR1、CDR2及びCDR3）を含むヒト化重鎖、

ここで、免疫グロブリンは、マウスDREG-200免疫グロブリンの結合親和性の3倍以内の結合親和性でL-セ렉チンリガンドに結合する。

【発明の詳細な説明】

L-セ렉チンに反応性のヒト化抗体

関連発明の引照

本出願は、米国特許出願シリアル番号第07/983,946号(1992年12月1日出願)の一部継続出願であり、これは、全ての目的のために引用されることにより、全体として本明細書の一部となる。

発明の分野

本発明は、概して、新規な生物製剤を開発するための組み換えDNA及びモノクローナル抗体技術の組み合わせに関し、そして特に、例えばL-セ렉チン蛋白質に特異的な(ヒトにおいて)非免疫原性の免疫グロブリンの製造及び、インビトロ及びインビボでのそれらの使用に関する。

発明の背景

互いに接着する細胞の能力は、発生、正常な生理学、及び疾患のプロセスにおいて重大な役割を演じる。この能力は、接着分子(一般的には糖蛋白質であり、細胞膜上で発現される)によって仲介される。しばしば、一つの細胞タイプ上の接着分子は、異なった細胞タイプ上で発現された他の接着分子に結合して、レセプター-カウンター-レセプターペアを形成する。接着分子の3つの非常に重要なクラ

スは、インテグリン、セ렉チン及び免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーメンバーである(スプリンガー、ネーチャー346:425(1990)、オスボーン、セル62:3(1990);ハインズ、セル69:11(1992)、これらは全て、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる)参照)。これらの分子は、白血球及び血小板の、それら自身との相互作用、及び細胞外マトリックス及び血管内皮との相互作用にとって特に重要である。

インテグリンは、 α 鎖(120~180kD)及び β 鎖(90~110kD)からなり、一般的には、短い細胞質領域を有する、ヘテロ二量体の貫膜糖蛋白質である。 α サブユニットは全て、 β サブユニットがそうであるように、互いに配

列相同性及び修飾 (motif) を共有する。 β_2 と称される β サブユニットを含む3つの公知のインテグリンは、T細胞、好中球及び単球の機能に対して重要である。LFA-1 ($\alpha_L \beta_2$) は、リンパ球、顆粒球及び単球上に広く分布されている。そのカウンター・レセプターは、ICAM-1 (及び、恐らく、より少ない重要性で ICAM-2) であり、それは、白血球を含む多くの細胞上で発現され、かつサイトカイン、例えばTNF及びIL-1によって血管内皮上で増幅制御されている (up-regulated) Igファミリー分子である。 α 又は β サブユニットのいずれかに対する抗体を用いてT細胞上のLFA-1をブロックすることは、接着依存機能、例えば標的細

胞のCTLで仲介される溶解を強く阻害する。Mac-1 ($\alpha_M \beta_2$) は、好中球及び単球上に分布されており、そのカウンター・レセプターはまたICAM-1 (及び、おそらくはICAM-2) である。とりわけ、Mac-1は、タイプ3補体レセプター (CR3) であり、C3b i フラグメントを結合する。第三の β_2 インテグリン、P150, 95 ($\alpha_X \beta_2$) もまた、好中球及び単球上に見いだされるが、重要性はより少ないようである。LFA-1、Mac-1及びP150, 95の α サブユニットはまた、それぞれ、CD名称、CD11a、CD11b及びCD11cが与えられ、一方、 β_2 もまたCD18と表されるので、LFA-1はCD11a/CD18であり、Mac-1はCD11b/CD18である。

3つの公知のセレクチンが存在し、それらは、以前にはLECCAMとして知られており、現在はL-セレクチン (また、LECAM-1、Mel-14又はLAM-1と呼ばれる)、E-セレクチン (また、ELAM-1と呼ばれる) 及びP-セレクチン (また、GMP140又はPADGEMと呼ばれる) と称されている。それらは全て、CDNAレベルにて配列決定されており、そして配列相同性及び修飾を共有し、レクチン様ドメインを含む。L-セレクチンは二重の役割を有し、それは、末梢リンパ節の高内皮性細静脈のためのT細胞上のホーミングレセプターであり、そして内皮のための好中球上の接着分子である (ハルマンら、Biochem. Biophys. Res.

Commun. 174:236 (1991)、これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる)。E-セレクトイン及びP-セレクトインは共に、サイトカインによって内皮上で誘導されるけれども、異なった速度論を有する。全ての3つのセレクトインは、恐らく、同じように他のカウンター-レセプターを有するけれども、L-セレクトインは、E-セレクトイン及びP-セレクトインの両者のための好中球上のカウンター-レセプターである(ピッカーら、セル66:921 (1991)、これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる)。特に、E-セレクトインは、炭水化物基シアリルルイスx (sLex)を結合し(ロウら、セル63:475 (1990)、これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる)、そして、この炭水化物は、L-セレクトイン上に顕著に存在する(ピッカーら、セル66:921 (1991))けれども、そのことは他の蛋白質上でも同様に起こりうる。E-セレクトインは、特に炎症の皮膚部位中で発現され、そしてまた、炎症に寄与しうる皮膚ホーミングT細胞のための接着分子として働く(ピッカーら、ネーチャー349:796 (1991)、これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる)。

種々の検定において、CD11a、CD11b、CD18、L-セレクトイン及びE-セレクトインに対する抗体は全

て、多かれ少なかれある程度、活性化された内皮細胞への好中球の結合をブロックするが、最も完全な阻害は、一般に、CD18に対する抗体とL-又はE-セレクトインに対する抗体の組み合わせによって達成される(例えば、ルシンスカス、J. Immunol. 142:2257 (1989)、これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる)参照)。最近の、しかし今では広く受け入れられているモデルは、これらの事実を、接着の3段階のプロセスを用いて説明している(ブッチャー、セル67:1033 (1991)、これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる)。最初の段階において、好中球は、セレクトインを介して炎症した血管内皮に可逆的に結合し、これは流動条件下で良好に結合し、文字どおり、好中

球を血管壁にそって転がす。次いで、好中球は、周囲の又は内皮によって放出される、IL-8、PAF及びC5aを含む種々の刺激剤によって活性化される。活性化された好中球は、L-セレクチン及び増幅制御Mac-1を放出する。最終段階において、内皮細胞上での、ICAM-1及び恐らく他のカウンター-レセプターへのMac-1の結合は、安定な接着及び内皮を通じての管外遊出を可能とする。

原則として、インテグリン及びセレクチン接着分子の抗体又は他のアンタゴニストは、好中球が内皮へ結合すること及び組織中へ管外遊出することを妨げることにより、このプロセスを抑えうる。従って、このような抗体は、炎症

が重要な要素である非常に多くの異なる疾患の治療に用いられ得る。

例えば、動物モデルにおいて、LFA-1及びMac-1の両者に結合する抗CD18抗体は、虚血-再灌流損傷を減少させるのに有用である（例えば、ヴェダーら、J. Clin. Invest. 81:939 (1988)；ヴェダーら、proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:2643 (1990)；米国特許第4,797,277号明細書を参照）。それらはまた、グラム陰性敗血症（ウォルシュら、Surgery 110:205 (1991)）を含む種々の損害に対する応答において、肺中の好中球仲介損傷を減少させる（ドエルシュックら、J. Immunol. 144:2327 (1990)及びミリガンら、J. Immunol. 148:1847 (1992)）。ウサギモデルにおいて、抗CD18抗体はまた髄膜炎による致死から保護する（ツオマネンら、J. Exp. Med. 170:959 (1990)）。それらはまた、T細胞機能をブロックするので、器官移植拒絶反応を防ぐのに又は治療するのに有用であり得る。

例えば、齧歯類への、L-セレクチン又はE-セレクチンに対する抗体の注入は、炎症を起こした腹膜内での好中球の蓄積を抑制した（ジュティラら、J. Immunol. 143:3318 (1989)及びミリガンら、J. Clin. Invest. 88:1396 (1991)）。生体内ビデオ顕微鏡検査は、抗L-セレクチン抗体が、ウサ

ギから外置した腸間膜細静脈の血管壁内皮に沿った白血球の転がりを強く阻害することを明らかにした（フォン アンドリアンら、*proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7538 (1991)）。抗E-セレクトリン抗体は、ラットの皮膚又は肺中の、免疫複合体付着物によって誘導される血管損傷を大きく減少し、そして実質上、それらの部位での好中球の蓄積を減少する（ムリジェンら、*J. Clin. Invest.* 88:1396 (1991)）。また、外因性喘息の霊長類モデルにおいて、抗E-セレクトリン抗体は、肺中への好中球の流入及びそれに伴う抗原吸入後の後期気道障害を大きく減少する（グンデルら、*J. Clin. Invest.* 88:1407 (1991)）。

ヒトL-セレクトリンに結合するマウスDREG-55、マウスDREG-56及びマウスDREG-200を含むいくつかの抗体が開発された（キシモトラ、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2244 (1990)これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）。これらの抗体は、部分的に或いは完全に、ヒトリンパ球の末梢リンパ節高内皮性細静脈への結合、及びヒト好中球の刺激されたヒト臍静脈内皮細胞への結合をブロックする（キシモトラ、*Blood* 78:805 (1991)これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）。これらの抗体の、好中球の内皮細胞への結合をブ

ロックする能力は、それらが結合する抗原、L-セレクトリンが潜在的な治療剤のための適した標的でありうることを示している。

不運にも、非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウスDREG-200の使用は、ヒトの治療において、特に以下に説明するような繰り返しの治療療養法においてある種の欠点を有する。マウスモノクローナル抗体は、例えば、比較的短い循環半減期を有し、そしてヒトに用いられた場合は、他の重要な免疫グロブリンの機能的特性を欠く。

恐らく更に重要には、非ヒトモノクローナル抗体は、ヒト患者中に注入されたときに免疫原性となるアミノ酸配列の実質的な長さを含む。多くの研究により、外来の抗体の注入の後、患者によって引き起こされた抗体に対する免疫応答が、

非常に強くなり得て、最初の処置後の抗体の治療的有用性を本質的に排除してしまうと示されている。更に、種々の疾患を治療するために、益々多数の種々のマウス又は他の（ヒトに）抗原性のモノクローナル抗体が開発されると予想されるので、いずれかの異なった非ヒト抗体を用いた最初の又は数回の処置の後、それに続く関連のない療法のための処置でさえ、交叉反応性のために、効果がなかったり、またそれ自身が危険であることがあり得る。いわゆる「キメラ抗体」（例えば、ヒト定常領域に連結されたマウス可変領域）の製造が幾分か成功であると証明されている一方、著しい免疫原性の問題が残っている。

免疫原性の問題を解決することを試みるために、数例の

ヒト化抗体が製造されている。ネズミからヒト化抗体への変化は、競合する考慮すべきことの妥協を含み、それに対する解答は、種々の抗体によって異なる。免疫原性を最少化するため、免疫グロブリンは、可能な限り多くのヒト受容体配列を保持すべきである。しかしながら、真正の結合特性を保持するため、免疫グロブリンフレームワークは、マウス供与体免疫グロブリン中のCDR領域の3次元コンホメーションに可能な限り近いCDR領域の3次元コンホメーションを保証すべくヒト受容体配列の十分な置換を含むべきである。これらの競合する考慮の結果として、現在まで製造された多くのヒト化抗体は、対応するネズミ抗体に比べて、結合親和性の著しい損失を示す。例えば、ジョーンズら、*Nature* 321: 522-525 (1986)；シャルマンら、*J. Immunol.* 147: 4366-4373 (1991)；ケッテルボロフ、*Protein Engineering* 4: 773-783 (1991)；ゴールマンら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4181-4185 (1991)；テンペストら、*BioTechnology* 9: 266-271 (1991)；リーチマンら、*Nature* 332: 323 (1988)及びヨーロッパ特許公開第0239400号公報（これらはそれぞれ、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）参照。

従って、実質上ヒト中で非免疫原性であるが、治療製剤又は他の用途に適した様式で容易にかつ経済的に製造され

る、L-セレクトイン抗原に特異的なヒト化免疫グロブリンの改良された形が必要である。本発明はこれら及び他の要求を満たす。

発明の概要

本発明は、例えば、炎症性のヒトの病気の治療において有用な新規な組成物を提供し、該組成物は、L-セレクトインに特異的に結合できるヒト化免疫グロブリンを含む。免疫グロブリンは、軽鎖／重鎖複合体の2つのペアを有することができ、少なくとも一つの鎖は、ヒトフレームワーク領域セグメントに機能的に連結された1以上のマウスの相補性決定領域を含む。例えば、マウス相補性決定領域は、追加の自然に随伴するマウスアミノ酸残基と共に又はなしで、ヒトフレームワーク領域中に導入されて、約 10^7 M^{-1} より強い親和性レベルにてL-セレクトインに結合できるヒト化免疫グロブリンを製造できる。これらのヒト化免疫グロブリンはまた、CDRを供与するマウスモノクローナル抗体のL-セレクトインへの結合をブロックできる。

本発明の、結合性フラグメント及びそれらの他の誘導体を含む免疫グロブリンは種々の組み換えDNA技術により容易に製造されることができ、トランスフェクションされた細胞、好ましくは不死化された真核細胞、例えばミエローマ又はハイブリドーマ細胞中で最終的に発現されうる。ヒト化免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第

一配列、及び所望の免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二配列セットを含むポリヌクレオチドが、合成的に又は適当なcDNAとゲノムDNAセグメントを組み合わせることによって製造されうる。

ヒト化免疫グロブリンは、実質的に純粋な形態にて単独で、又は化学療法剤例えば非ステロイド系抗炎症薬剤（例えばアスピリン）、コルチコステロイド又は免疫抑制剤と共に利用されうる。これらの化合物は全て、特に、炎症性の病気の治療において有用である。ヒト化免疫グロブリン又はそれらの複合体は、製剤学的に許容できる投薬形態にて調製されることができ、その形態は投与の様式に依存して変化する。

図面の簡単な説明

図1. マウスDREG-200抗体の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のcDNA配列及び翻訳アミノ酸配列。成熟重鎖は20番目のアミノ酸(E)で始まり、成熟軽鎖は21番目のアミノ酸(D)で始まり、それぞれの前にはシグナル配列がある。

図2. マウスDREG-200抗体(上段)及びヒト化DREG-200抗体(下段)の、成熟軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域のアミノ酸配列。各鎖の3つのCDRに下線を引いた。ヒト化抗体中においてマウスアミノ酸又は典型的なヒトアミノ酸で置換されたフレームワーク中の残基に二重下線を引いた。

図3. XbaI部位で開始しそして終わるヒト化DREG-200抗体の軽鎖(A)及び重鎖(B)可変領域をエンコードする遺伝子のヌクレオチド配列、及びシグナル配列を含む翻訳されたアミノ酸配列。

図4. マウス及びヒト化IgG1及びIgG4DREG-200抗体の競合結合。標的細胞は、L2-1細胞(マウスプレ-Bセルライン)であり、これは、ヒトL-セレクトリン遺伝子でトランスフェクションされ、それ故ヒトL-セレクトリンを発現する(ベルグラ、Biochem. Biophys. Res. Comm. 184:1048(1992))。5×10⁵の細胞を、¹²⁵Iラベルされたトレーサーマウス抗体(2µCi/µg)の3ngを用いて、示された如くの順次増加させた量のマウス又はヒト化競合物抗体と一緒にして、0.2mlの結合緩衝液(PBS+2%FBS+0.1%アジド)中で4℃にて1時間インキュベートした。細胞を洗浄し、ペレット化し、そしてそれらの結合した放射活性を測定した。結合及び遊離のトレーサー抗体の濃度を計算した。

図5. IL-1で刺激されたヒト臍帯内皮細胞(HUVEC)に対するヒト好中球の結合。好中球を、まず、示したように、関連性のない対照抗体、マウスDREG-200抗体又はヒト化IgG1DREG-200抗体で処理又は未処理のままにした。

図6. ヒト化DREG-200による虚血-再灌流された心臓組織の保護。図は、ヒト化DREG-200又は対

照抗体で処理されたネコについて、左から右へと、危険にある領域／全心室領域、壊死組織領域／危険領域、及び壊死組織領域／全左心室領域を示す。ブラケットは6匹のネコにおける+／-SEMを表し、バーの高さは平均である。

定義

言葉“実質的に同一”又は“実質的に相同”は、2つのペプチド配列が、例えばデフォルトギャップウエイトを用いたプログラムGAP又はBESTFITにより最適に一行に並べられた場合に、少なくとも65パーセントの配列同一、好ましくは少なくとも80又は90パーセントの配列同一、更に好ましくは少なくとも95パーセントの配列同一又はそれ以上（例えば、99パーセントの配列同一）を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基の位置は、同類アミノ酸置換によって異なる。

アミノ酸置換を同類又は同類でないと分類する目的のために、アミノ酸を以下にグループ分けする：グループI（疎水性側鎖）：ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile、グループII（中性親水性側鎖）：cys、ser、thr、グループIII（酸性側鎖）：asp、glu、グループIV（塩基性側鎖）：asn、gln、his、lys、arg、グループV（鎖配向に影響する残基）：gly、pro、及びグループVI（芳香族側鎖）：trp、tyr、phe。同類置換は、同じクラス中でのアミノ酸間の置換を含む。非同類置換は、これらのクラスの一つの

メンバーと他のクラスのメンバーを交換することである。

免疫グロブリンの成熟重鎖及び軽鎖の可変領域からのアミノ酸は、それぞれHx及びLxと表され、ここでxは、カバットの図（免疫学的な興味のある蛋白質の配列、ナショナル インスティテューツ オブ ヘルス、ベセスダ、MD、1987及び1991）に従ったアミノ酸の位置を表している番号である。カバットは、各サブクラスのための抗体のために多くのアミノ酸配列を列挙しており、そしてそのサブクラス中の各残基位置について最も共通に生じるアミノ酸を列挙している。カバットは、列挙した配列中の各アミノ酸に対して残基番号を割り当てるための方法を用い、そして残基番号を割り当てるためのこの方法はこの分野で標

準となっている。カバットの図は、目的の抗体をカバットの共通配列の一つとともに一列に並べることによって、彼の概論に含まれない他の抗体にまで広げられる。カバットの番号付与の系の使用は、種々の抗体において等価の位置におけるアミノ酸を容易に同定する。例えば、ヒト抗体のL⁵⁰位置のアミノ酸は、マウス抗体のアミノ酸位置L⁵⁰と等価の位置を占める。

N末端からC末端へと、軽鎖及び重鎖は共に、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及びFR4領域を含む。各ドメインに対するアミノ酸の割り当ては、カバット(1987)及び(1991)、前掲、又はチョチアとレスク、J. Mol. Biol. 196:901-917(1987); チョチアら、ネイチャー342:

878-883(1989)の定義に従っている。

発明の詳細な説明

一般に、以下で用いる学術用語、及び以下に記した細胞培養、分子遺伝学、及び核酸化学及びハイブリダイゼーションにおける研究室的方法は、本技術分野において良く知られておりかつ通常用いられるものである。標準的技術が、組み換え核酸法、ポリヌクレオチド合成、細胞培養、及びトランスジェン導入(例えば、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション)のために用いられる。一般に、酵素反応、オリゴヌクレオチド合成、及び精製段階は、製品仕様書に従って行われる。技術及び方法は、一般に、本技術分野で慣用の方法及びこの明細書を通じて提供される種々の一般の参照文献に従って行われる。その中の方法は、本技術分野で良く知られていると思われ、読者の利便のために提供される。その中に含まれる全ての情報は、引用することにより本明細書の一部となる。

L-セレクトインに対するヒト化抗体

本発明に従って、L-セレクトイン関連エピトープに特異的に反応するヒト化免疫グロブリンが提供される。これらの免疫グロブリンは、通常、少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 好ましくは $10^8 M^{-1} \sim 10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 又はそれ以上のL-セレクトインに対する結合親和性を有し、そして例えば、好中球に結合できる。ヒト化免

疫グロブリンは、ヒトフレ

ームワークを有し、そして、L-セレクトインに特異的に反応する免疫グロブリン、代表的にはマウス免疫グロブリンからの1以上の相補性決定領域(CDR)を有する。好ましい実施態様において、1以上のCDRがマウスDREG-200抗体から由来し、そしてヒト化免疫グロブリンがIgG1又はIgG4イソタイプである。従って、本発明の免疫グロブリンは、大量に経済的に製造されることができ、例えば、種々の技術によって、ヒト患者における炎症性の病気の治療に用いられることが判った。

基本的な抗体の構造単位は、テトラマーを構成すると知られている。各テトラマーは、ポリペプチド鎖の2つの同一のペアから成り、各ペアは、1つの“軽”鎖(約25 kD)及び1つの“重”鎖(約50~70 kD)を有する。各鎖のNH₂末端は、主として抗原認識に寄与する約100~110或いはそれ以上のアミノ酸の可変領域から始まる。各鎖のCOOH部分は、主としてエフェクター機能に寄与する定常領域を定めている。

軽鎖は、カッパ又はラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ又はイプシロンとして分類され、それぞれ抗体のイソタイプをIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEと決定づけている。軽鎖及び重鎖内では、可変領域及び定常領域が、約12或いはそれ以上のアミノ酸の“J”領域によって連結されており、重鎖はまた約10より多いアミノ酸の“D”領域を含む(一般に、ファンダメンタル イムノロジー、ポール

W. 編、第7章、131-166頁、ラベンプレス、N. Y. (1984) (これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) 参照)。

各軽鎖/重鎖ペアの可変領域は、抗体結合部位を形成する。鎖は全て、3つの超可変領域(この領域はまた相補性決定領域又はCDRと呼ばれる(“免疫学的興味のプロテイン配列”、カバット E. ら、U. S. デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービス (1987) ; 及びチョチア アンド

レスク、J. Mol. Biol.、196:901-917 (1987) (これらは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) 参照)) によって連結された比較的保存されたフレームワーク領域の同じ普遍的構造を示す。各ペアの2つの鎖からのCDRは、フレームワーク領域によって一列に並べられ、特異的なエピトープへの結合を可能とする。

本明細書において、言葉「免疫グロブリン」は、免疫グロブリン遺伝子によって実質的にエンコードされる1以上のポリペプチドからなる蛋白質を云う。認識された免疫グロブリン遺伝子は、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン及びミュー定常領域遺伝子、並びにミリアド (myriad) 免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。免疫グロブリンは、例えばFv、Fab及び (Fab')₂ 並びに二価抗体 (例えば、ランザベチアら、Eur. J. Immunol. 17:105 (1987)) を含む

抗体の他に種々の形態で、及び一本鎖 (例えば、ヒューストンら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 85:5879-5883 (1988) 及びバードら、サイエンス、242:423-426 (1988) (これらは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) にて存在しうる。(一般に、フードら、Immunology (ベンジャミン、N. Y.、第2版、1984)、ハルロウ アンド レーン、Antibodies: A Laboratory Manual (コールド スプリング ハーバー ラボラトリー、1988) 及びハンカピラー アンド フード、ネーチャー、323:15-16 (1986)、これらはそれぞれ、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) 参照)。

キメラ抗体は、軽鎖遺伝子及び重鎖遺伝子が、典型的には遺伝子工学により、異なった種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから構成されている抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体からの遺伝子の可変 (V) セグメントは、ヒト定常 (C) セグメント、例えば、 γ_1 及び γ_4 と連結されうる。従って、他の哺乳動物種も用いられ得るけれども、典型的な治療的キメラ抗体は、マウス抗体からのV又は抗原結合ドメイン及びヒト抗体からのC又はエフェクタード

メインから成るハイブリッド蛋白質である。

本明細書において、言葉「フレームワーク領域」は、カバットら（前掲）による定義の如く、単一種中の種々の免

疫グロブリンの中で、比較的保存されている（即ち、CDR以外の）免疫グロブリン軽鎖及び重鎖可変領域の部分を云う。本明細書において、「ヒトフレームワーク領域」は、自然に生じるヒト抗体のフレームワーク領域と又はいくつかのこのような抗体の共通配列と実質的に同一（約85%又はそれ以上）であるところのフレームワーク領域である。

本明細書において、言葉「ヒト化免疫グロブリン」は、ヒトフレームワーク、非ヒト抗体からの少なくとも一つのCDRを含む免疫グロブリンを云い、その中に存在する何らかの定常領域は、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一である、即ち少なくとも約85～90%、好ましくは少なくとも95%同一である。従って、恐らくCDRを除く、ヒト化免疫グロブリンの全ての部分は、1以上の天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。例えば、ヒト化免疫グロブリンは、キメラマウス可変領域／ヒト定常領域抗体を含まない。

ヒト化抗体は、ヒトの治療における使用のために、マウスに比べ、そしていくつかの場合にはキメラ抗体に比べ、少なくとも3つの潜在的な利点を有する。

1) エフェクター部分がヒトであるので、ヒト免疫系の他の部分とより良好に相互作用しうる（例えば、補体依存性細胞障害（CDC）又は抗体依存性細胞障害（ADCC）による、より効率的な標的細胞の破壊）。

2) ヒト免疫系は、ヒト化抗体のフレームワーク又はC領域を異物として認識せず、従って、このような注入され

た抗体に対する抗体応答は、全部が異物であるマウス抗体又は一部分が異物であるキメラ抗体より少ない。

3) 注入されたマウス抗体は、通常の抗体の半減期よりも非常に短い、ヒト内での循環における半減期を有すると報告されている（ショー、D. ら、J. Im

munol. 138:4534-4538 (1987))。注入されたヒト化抗体は、恐らく、自然に生じるヒト抗体の半減期とより近い半減期を有し、より小さい又はより少ない頻度の投与量を与えること可能とする。

一つの観点において、本発明は、L-セレクトインの所望のエピトープに結合できる免疫グロブリン、例えばモノクローナル抗体マウスDREG-200、マウスDREG-55又はマウスDREG-56（キシモトラ、(1990)、前掲、これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）からの重鎖及び／又は軽鎖CDRをエンコードする組み換えDNAセグメントに向けられている。これらの領域をエンコードするDNAセグメントは、典型的には、適当なヒトフレームワーク領域をエンコードするDNAセグメントに連結される。好例としてのDNA配列（これらは、発現すると、モノクローナル抗体マウスDREG-200の重鎖及び軽鎖CDRを含むポリペプチド鎖をコードする）は、図1に含まれる。コドン縮重及び重要でないアミノ酸置換のため、以下に詳述する如く、他のDNA配列が容易にそれらの配列の代わりに用いられうる。ヒト化免疫グロブリンのデザイン及び

製造の詳細な記載のためには、共通して譲渡されたシリアル番号、第07/290,975号及び07/310,252号明細書（それぞれ、1988年12月28日及び1989年2月13日出願）、これらは共に、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）参照。

DNAセグメントは、典型的には、更に、ヒト化免疫グロブリンコーディング配列に作動可能に連結された発現制御DNA配列を含み、自然に随伴されている又は異種のプロモーター領域を含む。好ましくは、発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換又はトランスフェクションできるベクター中の真核生物のプロモーター系であるが、原核生物宿主のための制御配列もまた用いられ得る。ベクターがいったん適当な宿主中に組み入れられると、宿主はヌクレオチド配列の高レベルでの発現に適した条件下で維持され、そして所望により、軽鎖、重鎖、軽鎖／重鎖ダイマー又は完全な抗体、結合フラグメント又は他の免疫グロブリン形態の収集及び精製が引き続き行われうる。

所望のヒト化抗体を最終的に発現できる本発明の核酸配列は、種々の異なったポリヌクレオチド（ゲノムDNA又はcDNA、RNA、合成オリゴヌクレオチド等）及び構成成分（例えば、V、J、D及びC領域）から、並びに種々の異なった技術により形成されうる。適当なゲノム配列と合成配列を連結することは、現在、製造の最も普通の方法であるが、cDNA配列もまた利用されうる（ヨーロッパ

パ特許第0239400号公報及びリーチマン、L. ら、ネイチャー332:323-327（1988）（これらは共に、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）参照）。

ヒト定常領域DNA配列は、良く知られた方法に従って、種々のヒト細胞、好ましくは不死化されたB細胞から単離されうる（カバット、前掲、及びWP87/02671参照）。本発明の免疫グロブリンを製造するためのCDRは、同様に、L-セレクトインに結合できるモノクローナル抗体から由来し、そしていずれかの便利な哺乳動物源（マウス、ラット、ウサギ又は良く知られた方法によって抗体を生産できる他の脊椎動物を含む）中で生産される。DNA配列のための適したソース細胞、及び免疫グロブリン発現及び分泌のための適した宿主細胞は、多くのソース、例えばアメリカン タイプ カルチャー コレクション（セルライン及びハイブリドーマのカatalog、第5版（1985）、ロックビル、MD、これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）から得ることができる。好ましい実施態様において、CDRは、それぞれ、マウスDREG-200、マウスDREG-55又はマウスDREG-56のCDR配列に対応する配列を有し、そしてマウスDREG-200、マウスDREG-55又はマウスDREG-56の対応するCDRアミノ酸配列をエンコードする同義性のヌクレオチド配列を含みうる。

本明細書に詳細に記したヒト化免疫グロブリンに加えて、他の「実質的に相同な」修飾された免疫グロブリンが、本技術分野の熟練者に良く知られた種々の組み換えDNA技術を利用して容易にデザインされそして製造されうる。実施例2

で議論したE μ 抗体以外のヒト抗体は、フレームワーク配列のソースとして用いられ得る。これらのフレームワーク配列は、CDRがそこから由来するところのマウスDREG-200可変フレームワークドメインと、高い程度の配列同一を示す。重鎖及び軽鎖可変フレームワーク領域は、同じ或いは異なったヒト抗体配列から由来しうる。実際は、重鎖及び軽鎖フレームワーク領域は、それぞれ、1より多いヒト抗体から由来しうる。ヒト抗体配列は、自然に生じるヒト抗体の配列であることができ、又はいくつかのヒト抗体の共通配列であり得る。カーターら、WO92/22653(1992)参照。

ヒト可変フレームワーク領域とネズミCDR領域を不自然に並べることは、不自然な立体的抑制を結果することができ、それは、もしあるアミノ酸残基の置換によって校正されなければ、結合親和性の損失をもたらす。置換のためのアミノ酸残基の選択は、幾分か、コンピューターモデル作製によって決定される。免疫グロブリン分子の3次元イメージを作製するためのコンピューターハードウェア及びソフトウェアは、広く入手できる。一般的に、分子モデルは、免疫グロブリン鎖又はそのドメインの判っている構造を根幹として作製される。モデル作製されるべき鎖は、判

っている3次元構造の鎖又はドメインと、アミノ酸配列の類似性に関して比較され、そして、最も大きい配列類似性を示す鎖又はドメインが、分子モデル構築のための開始点として選択される。判っている開始構造は、モデル作製されている免疫グロブリン鎖又はドメイン中の実際のアミノ酸と開始構造中のアミノ酸間の相違を考慮するように修飾されている。次いで、修飾された構造は、複合免疫グロブリンへと組み立てられる。最後に、モデルは、エネルギー最少化により、かつ、全ての原子が互いに適した距離内にあり、そして結合の長さ及び角度が化学的に許容できる限界内であることを確認することにより改善される。実施例2は、更に詳細に、マウスDREG-200抗体の可変領域のための3次元コンピューターモデルを作製するために取られる段階を議論している。このモデルは、今度は、ヒトフレームワーク構造で置換されたマウスDREG-200相補性決定領域を含む抗体の3次元構造を予測するための開始点として役立ちうる。以下に

議論されるべき更なるアミノ酸置換が導入された場合は、その構造を示す追加のモデルが構築されうる。

一般に、ネズミでのヒトアミノ酸残基の置換は最少にすべきである。なぜなら、ネズミ残基の導入は、ヒト中で、抗体がHAMA応答を誘発する危険を増加させるからである。置換のためのアミノ酸は、CDRコンフォメーション及び／又は抗原への結合におけるそれらの起こりうる影響に基づいて選択される。このような起こりうる影響の研究

は、モデル作製、特定の位置でのアミノ酸の特性の試験、又は特定のアミノ酸の置換又は突然変異誘発の影響の経験的観察に基づく。

アミノ酸がマウスDREG-200可変フレームワーク領域及び等価のヒト可変フレームワーク領域間で異なる場合には、もし、アミノ酸が、

(1) 直接、抗原と非共有結合的に接触する、又は

(2) CDR領域と隣接しているか、さもなければ、CDR領域と相互作用している（例えば、CDR領域の約4～6オングストローム以内にある）

と合理的に予測されるならば、ヒトフレームワークアミノ酸は通常、等価のマウスアミノ酸によって置換されるべきである。

置換の他の候補は、その位置においてヒト免疫グロブリンにとって普通でない受容体ヒトフレームワークアミノ酸である（例えば、ヒトEu抗体のアミノ酸H113）。これらのアミノ酸は、もっと典型的なヒト免疫グロブリンの等価の位置からのアミノ酸で置換されうる。或いは、マウスDREG-200中の等価の位置からのアミノ酸が、このようなアミノ酸が等価の位置においてヒト免疫グロブリンの代表的なものである場合に、ヒトフレームワーク領域中に導入されうる。

一般に、全ての又は殆どのアミノ酸の置換が上記基準を満たしているのが望ましい。しかしながら、時折、個々のアミノ酸が上記基準にあっているかどうかについては曖昧

であり、そして、代わりの様々な免疫グロブリンが製造され、その内の一つはそ

の特定の置換を有するが他のものは有さない。本発明のヒト化抗体は、通常、以下の位置、すなわちL 8 7、L 5 4、L 6 6、L 7 6及びL 9 3の内の少なくとも1、2、3、4及び更に通常は5つにおいて、対応するマウスD R E G - 2 0 0残基を伴ったマウス軽鎖フレームワーク残基での置換を含む。ヒト化抗体はまた、通常、以下の位置、すなわちH 9 3、H 9 5、H 9 8、H 1 1 1、H 1 1 2、H 1 1 5、H 3 0、H 9 8、H 1 1 1、H 2 7、H 4 8及びH 7 2の内の少なくとも1、3、5、7、9、10、11及び更に通常は12において、マウス重鎖フレームワーク残基での置換を含む。好ましい実施態様において、ヒト重鎖受容体免疫グロブリンがE_uである場合は、重鎖もまたH 1 1 3での置換を含む。この位置は、通常、更に典型的なアミノ酸残基を有するヒト免疫グロブリンの等価位置からのアミノ酸で置換されている。

ヒト化抗体中のC D R領域は、通常実質的に同一であり、そして更に通常は、マウスD R E G - 2 0 0抗体中の対応するC D R領域と同一である。しかしながら、時折、C D R領域中の残基の一つを、例えばL-セレクチンのリガンドの結合部位に対する類似性を作るために、変えることも望ましい。通常は望まないけれども、得られたヒト化免疫グロブリンの結合親和性に感知できるほどに影響しないで、C D R残基の1以上の同類アミノ酸置換を行うことも時々可能である。

上記で議論した特定のアミノ酸置換以外に、ヒト化免疫グロブリンのフレームワーク領域は、通常実質的に同一であり、更に普通には、それらが由来したところのヒト抗体のフレームワーク領域と同一である。しかしながらいくつかの実施態様においては、フレームワーク領域は、いくつかのアミノ酸の置換、末端及び中間での付加や欠損等によって、その1次構造レベルにて天然の配列から変化することができる。20の慣用のアミノ酸の立体異性体（例えば、D-アミノ酸）、不自然なアミノ酸、例えば α 、 α -二置換したアミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸、及び他の慣用でないアミノ酸もまた、本発明のポリペプチドのための適した構成成分であり得る。もちろん、フレームワーク中のアミノ酸の多くは、抗体の特異性又は親和性に対しては、殆ど或いは全く、直接には寄与しない。従って、フレームワーク残基の多くの個々の同類置換は、得られたヒト化免疫グロ

ブリンの特異性又は親和性を感知できるほど変えることなしに許容され得る。しかしながら、一般的にこのような置換は望ましくない。遺伝子の修飾は、種々の良く知られた技術、例えば、特定部位の突然変異誘発（ギルマン アンド スミス、Gene 8:81-97 (1979) 及びロバーツら、ネーチャー 328:731-734 (1987)、これらは共に、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）参照）によって、容易に達成されうる。

或いは、一次の抗体構造の部分のみを含むポリペプチド

フラグメントを製造することができ、該フラグメントは1又はそれ以上の免疫グロブリン活性（例えば、結合活性）を有する。これらのポリペプチドフラグメントは、本技術分野にて良く知られた方法によって完全な抗体を蛋白質分解することにより、又は、特定部位の突然変異誘発を用いて停止コドンを変化させることにより、及びpVg1-dhfrの所望の位置、例えばFabフラグメントを製造するためにCH1の後に、又は(Fab')₂フラグメントを製造するためにヒンジ領域の後に挿入することにより製造されうる。一本鎖抗体は、DNAリンカーを用いてVL及びVHを連結することにより製造されうる（ヒューストンら、前掲、及びバードら、前掲、参照）。一つの例として、Fv又はFabフラグメントが、ブフナー アンド ルドルフ（Bio/Technology 9:157-162 (1991)）及びスケラら（Bio/Technology 9:273-277 (1991)）の方法（これらは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）に従って、E. coli中で製造されうる。Fv及びFabはまた、真核生物細胞、好ましくは哺乳動物細胞中で、エンコードしているポリヌクレオチドを発現することにより製造されうる。また、多くの遺伝子と同様に、免疫グロブリン関連遺伝子は分離された機能的領域を含み、それぞれが1以上の別個の生物学的活性を有しているので、遺伝子は、新規な性質を有している融合蛋白質（例えば、イムノトキシン）を製造するために、他の

遺伝子からの機能的領域（例えば、酵素、共通に譲渡された米国特許シリアル番号第132, 387号明細書（1987年12月15日出願）、これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）に融合されうる。

バクテリア宿主中でのヒト化免疫グロブリン配列の発現は、CDR領域を突然変異誘発し、かつL-セレクトインに対する高い親和性及び／又は高い特異的結合性を有するヒト化免疫グロブリンCDR変異型のためにスクリーニングされることが出来るバクテリオファージ表現（display）ライブラリーを製造することにより、より高い親和性のヒト化免疫グロブリン配列を選択するために有利に用いられ得る。このような鋭敏な親和性の潜在的な利点は、L-セレクトイン以外の分子との結合親和性が改善された及び／又は交叉反応が減少されたヒト化免疫グロブリンCDR変異型の製造である。免疫グロブリン可変領域配列を有するファージディスプレイライブラリーを製造するための方法は、本技術分野において提供されており、例えば、セサリーニ、F E B S L e t t 307:66-70（1992）；スイマーら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 89:3756-60（1992）；グラムら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 89:3576-80（1992）；クラックソンら、N e e - C h a r 352:624-8（1991）；スコット アンド スミス、S a i e n s 249:386-90

（1990）、ガラードら、B i o / T e c h n i q u e s 9:1373-1377（1991）（これらは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）を参照せよ。得られた親和性が鋭敏化されたCDR変異型ヒト化免疫グロブリン配列は、次いで、効率的な発現に適した宿主中で発現される。

既に記したように、DNA配列は、配列を発現制御配列に作動可能に連結（即ち、発現制御配列が機能することを保証するように配置）した後に、宿主中で発現される。これらの発現ベクターは、典型的には、エピソードとして或いは宿主染色体DNAの肝要な部分として宿主中で複製可能である。通常、発現ベクター

は、選択マーカー、例えばテトラサイクリン耐性 (tet^R)、G418耐性 (neo^R)、ミコフェノール酸耐性 (gpt) 又はHSV-tkを含み、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能とする (例えば、米国特許第4,704,362号明細書 (これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) 参照)。

E. coli は、本発明のDNA配列をクローニングするために特に有用な一つの原核生物宿主である。使用に適した他の微生物宿主は、バチルス、例えば枯草菌、及び他の腸内細菌科、例えばサルモネラ、セラチア、及び種々のシェードモナス種を含む。これらの原核生物宿主において、また発現ベクターを作ることでもでき、該ベクターは、典型的には、宿主細胞と適合した発現制御配列 (例えば、複製

起点) を含む。更に、任意の数の種々の良く知られたプロモーター、例えば、ラクトースプロモーター系、トリプトファン (trp) プロモーター系、 β -ラクタマーゼプロモーター系、又は λ ファージからのプロモーター系が存在してもよい。プロモーターは、典型的には (場合によりオペレーター配列と共に) 発現を調節し、そして、転写及び翻訳を開始し、完成させるためのリボソーム結合部位配列等を有する。

他の微生物、例えば酵母もまた発現ために用いられ得る。サッカロミセスは、発現制御配列、例えば、3-ホスホグリセレートキナーゼ又は他の解糖酵素を含むプロモーター、及び複製起点、末端配列、及び所望の類似のものを有する適当なベクターを伴った好ましい宿主である。

植物又は植物細胞培養物が、本発明のヒト化免疫グロブリンの発現のために用いられ得る (ラリック アンド フライ、Hum. Antibodies Hybridomas 2 (4) : 172-89 (1991) ; ベンヴェヌトラ、Plant Mol. Biol. 17 (4) : 865-74 (1991) ; デューリンら、Plant Mol. Biol. 15 (2) : 281-93 (1990) ; ハイアットら、ネイチャー 342 : 76-8 (1989)、これらは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる)。好ま

しい植物宿主は、例えば、アラビドプシス (*Arabidopsis*)、ニコチアナ タバカム (*Nicotiana tabacu*

m)、ニコチアナ ルスチカ (*Nicotiana rustica*) 及びソラヌム ツベロズム (*Solanum tuberosum*) を含む。本発明のヒト化抗L-セレクチン抗体をエンコードするポリヌクレオチド配列を発現するための好ましい発現カセットは、その中で、ヒト化免疫グロブリン鎖をエンコードする挿入されたポリヌクレオチド配列が重複したエンハンサーとともにCaMV 35Sプロモーターに作動可能に連結されているところのプラスミドpMOG18である。pMOG18は、シーモンズら、*Bio/Technology* 8:217-221 (1990) (これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) の方法に従って用いられる。或いは、植物中でのヒト化免疫グロブリンの発現のための好ましい実施態様は、ハイアットらの方法 (前掲) に従う。但し、本発明のヒト化抗L-セレクチン抗体をエンコードするポリヌクレオチド配列を、ハイアットら (前掲) によって用いられた免疫グロブリン配列に代えて用いる。アグロバクテリウム ツミファシエンスのT-DNAに基づいたベクターもまた、ヒト化免疫グロブリン配列を発現するために用いられることができ、好ましくは、このようなベクターは、スペクチノマイシン耐性又は他の選択性マーカーをエンコードするマーカー遺伝子を含む。

昆虫細胞培養物もまた、本発明のヒト化免疫グロブリンを製造するために用いられることができ、代表的には、バ

キュロウイルスに基づいた発現系が用いられる。ヒト化免疫グロブリンは、ブトリッツら、*Bio/Technology* 8:651-654 (1990) の方法 (これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) に従って、ヒト化免疫グロブリンをエンコードするポリヌクレオチド配列を発現することにより製造されうる。ブトリッツらの方法に、本発明のヒト化抗L-セレクチン抗体をエンコードするポリヌクレオチド配列をブトリッツらのマウスモノクローナルAb 6A4重鎖及び軽鎖cDNA配列の代わりに挿

入するという変更を加えることができる。

微生物及び植物に加えて、哺乳動物細胞培養物もまた、本発明のポリペプチドを発現し、製造するために用いられ得る（ウイナッカー、遺伝子からクローンへ（VCH パブリッシャーズ、N. Y.、1987（これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）参照）。哺乳動物細胞は、実際に好ましい。なぜなら、完全な免疫グロブリンを分泌できる多くの適した宿主セルラインが本技術分野で開発されており、それらは、CHOセルライン、種々のCOSセルライン、HeLa細胞、好ましくはミエローマセルライン等、又は形質転換されたB細胞又はハイブリドーマを含む。これらの細胞の発現ベクターは、発現制御配列、例えば、複製起点、プロモーター、エンハンサー（クイーンら、Immunol. Rev. 89:49-68（1986）、これは、全ての目

的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）、及び必要なプロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写ターミネーター配列を含む。好ましい発現制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、サイトメガロウイルス等から由来のプロモーターである。一般に、選択性マーカー、例えばneo^R発現カセットは、発現ベクター中に含まれる。

本発明のヒト化免疫グロブリンをエンコードするトランスジーンは、所望のヒト化免疫グロブリンを、典型的には、回収可能な体液、例えばミルク又は血清中に発現するトランスジェニック非ヒト動物を製造するために用いられ得る。このようなトランスジーンは、通常は連結されたエンハンサー、例えば齧歯類の免疫グロブリンエンハンサー又はカゼイン遺伝子プロモーター／エンハンサー（ブーラーら、Bio/Technology 8:140-143（1990）；メアデら、Bio/Technology 8:443-446（1990）、これらは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）と共に、プロモーターに作動可能に連結されたヒト化免疫グロブリンをエンコードするポリヌクレオチド配列を含む。トランスジーンは、本技術分野で示

されそして以下に記載された方法に従って、相同な組み換え構築物のために細胞及び胚中に移入されうる。好ましい非ヒト動物は、

マウス、ラット、ヒツジ、ウシ及びヤギを含み、ウシミルク中での発現が特に好ましい。WO 91/08216 (1991) (これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) 参照。ヒト化抗体の精製は、免疫グロブリン精製のための本技術分野で公知の精製方法により達成される。

目的のDNAセグメント (例えば、重鎖及び軽鎖をエンコードする配列及び発現制御配列) を含むベクターは、宿主細胞のタイプに応じて変更を加えた良く知られた方法により宿主細胞中に移入されうる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは、通常、原核生物細胞のために利用され、一方、リン酸カルシウム処理、リポフェクション、バイオリスティックス (biolistics)、ウイルスに基づいたトランスダクション、又はエレクトロポレーションが他の細胞宿主のために用いられ得る。タングステン粒子バリスティックトランスジェネシスは、植物細胞及び組織のために好ましい。(一般に、マニアティスら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (コールド スプリング ハーバー プレス、1982) (これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) 参照)。

いったん発現されれば、本発明の、完全な抗体、それらのダイマー、個々の軽鎖及び重鎖、または免疫グロブリンの他の形態は、本技術分野の標準方法に従って精製されこ

とができ、該方法は、硫酸沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含む (一般に、スコープス、R.、蛋白質精製 (スプリンガーフェルラーク、N. Y.、1982) (これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) 参照)。薬学的用途のためには、少なくとも約90~95%の均質性の実質上純粋な免疫グロブリンが好ましく、98~99%或いはそれ以上の均質性が最も好ましい。いったん部分的に又は所望の均質性まで精製されると、その後、ポリペプチドは、治療的に (体

外的を含む)、又は検定方法、例えば免疫蛍光染色等の開発及び実行において用いられ得る。一般に、免疫学的方法、第I及びII巻(ルフコビッツ アンド ペルニス編、アカデミック プレス、NY、1979及び1981)参照。

好ましい実施態様において、標準結合条件(例えば、25℃での、2パーセントのウシ胎児血清を含んだリン酸塩緩衝食塩水)にて少なくとも $1 \times 10^7 M^{-1}$ の結合親和性をもってL-セレクチンに結合するヒト化免疫グロブリンが製造される。このようなヒト化免疫グロブリンの一つの例は、図2に示されたアミノ酸配列を含むヒト化DREG-200抗体である。(以下、ヒト化DREG-200抗体を、ときどき「hu DREG-200」と云う)。マウスDREG-55又はマウスDREG-56からのCDRを含むヒト化免疫グロブリンもまた、少なくとも $1 \times 10^7 M^{-1}$ の親和性をもってL-セレクチンに結合できる。

本発明のヒト化抗体は、標準結合条件にて、好ましくは少なくとも $1 \times 10^8 M^{-1}$ の親和性をもって、更に好ましくは少なくとも $1 \times 10^9 M^{-1}$ の親和性をもって、有利には少なくとも $1 \times 10^{10} M^{-1}$ 又はそれより強い親和性をもって、ヒトL-セレクチンに結合する。通常、ヒト化免疫グロブリンの結合親和性は、それが由来するマウス免疫グロブリンの3のファクター内である。例えば、マウスDREG-200抗体の親和性は、約 $10^8 M^{-1}$ である。

コンピューター

本発明の他の一つの観点において、モニター上に抗体の3次元イメージを示すコンピュータープログラムが提供される。例えば、UNIXオペレーティングシステム下で動き、分子モデリングパッケージQUANTA (Polygen Corp. USA)を用いるシリコングラフィックスIRIS 4Dワークステーションが適している。コンピューターは、ヒト化抗体の変異体を作るのに有用である。一般に、本発明の抗体は既に、満足のいく結合親和性を提供している。しかしながら、なお強い結合親和性をもった抗体を、あるアミノ酸残基の更なる変更により同定できると見込まれる。3次元イメージはまた多くの重要でないアミノ酸を同定し、該アミノ酸は、抗体の結合親和性に検出されるほど影響しない同類置換の対象となりうる。全体的に、同類置換でさえ免疫グロブリンの特性に著

しく影響するかもしれない。しかしながら、多くの個々の同類置

換は、免疫グロブリンの特性を著しく損なうことはないようである。

L-セ렉チンに対するヒト抗体

本発明の他の一つの観点において、L-セ렉チンに対するヒト抗体が提供される。これらの抗体は、下記する種々の技術により製造される。いくつかのヒト抗体は、競合結合実験乃至は他の方法により、特定のマウス抗体、例えばマウス D R E G - 2 0 0 又はそのヒト化したものと同じエピトープ特異性を有するように選択される。これらの抗体は、特に、ヒト化 D R E G - 2 0 0 について示された有用な治療的特性を共有しているようである。

要求されるエピトープ特異性を有する抗体もまた、好中球-内皮細胞相互作用をブロックする能力のスクリーニングにより同定されうる。このような相互作用を検出するための一つの単純な視覚検定は、キシモトラ (1991) (前掲) によって記載されている。要約すれば、ヒト臍静脈細胞の単一層を I L - 1 で刺激する。好中球を、テスト下で抗体で予備処理して或いはしないで、特定の条件下で単一層に加え、そして接着する好中球の数を、顕微鏡下で測定する。ある方法において、好中球は、ヒト白血球接着性欠損患者から得られる。アンダーソンら、Ann. Rev. Med. 38:175 (1987) 参照。このような患者からの好中球はインテグリンレセプターを欠損している。該レセプターの好中球に対する結合は、L-セ렉チ

ン結合をブロックする効果を覆い隠すかもしれない。

a. トリオーマ方法論

基本的なアプローチ及びこのアプローチに用いるための代表的な細胞融合パートナー、S P A Z - 4 は、オストベルグら、Hybridoma 2:361-367 (1983) ; オストベルグ、米国特許第4,634,664号明細書; 及びエングルマンら、米国特許第4,634,666 (これらはそれぞれ、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) に記載されている。この方法によって得られる抗体産生セルラインはトリオーマと呼ば

れる。何故なら、それらは、3つの細胞、即ち2つのヒト細胞及び一つのマウス細胞から由来するからである。まず、マウスミエローマラインをヒトBリンパ球と融合させて、非抗体産生異種間ハイブリッド細胞、例えば、オストベルグ（前掲）に記載されたSPA Z-4セルラインを得る。次いで、異種間細胞を、免疫されたヒトBリンパ球と融合させて、抗体産生トリオーマセルラインを得る。トリオーマは、ヒト細胞から作られる通常のハイブリドーマよりも安定に抗体を産生すると判った。

免疫されたBリンパ球は、ヒト供与体の血液、脾臓、リンパ節又は骨髓から得られる。L-セレクトインを用いた生きているヒトのインビボでの免疫化は、有害な応答を引き起こす危険故、通常望ましくない。従って、Bリンパ球は、通常、L-セレクトインポリヌクレオチド、その抗原性フ

ラグメント又はこれらのいずれかを産生する細胞を用いて、インビトロで免疫される。もし、特定の抗原又はエピトープに対する抗体が望まれるならば、インビトロ免疫化のためにその抗原又はそのエピトープを用いるのが好ましい。Bリンパ球は、典型的には、培地、例えば10%ヒトプラズマが加えられたRPMI-1640（エングルマン、前掲、参照）中で、7～14日の期間、抗原に曝される。

免疫されたBリンパ球は、良く知られた方法で、異種間ハイブリッド細胞、例えばSPA Z-4と融合される。例えば、細胞は、約37℃にて、約5～10分間、40～50%のポリエチレングリコール（MW、1000～4000）で処理される。細胞は、融合混合物から分離され、そして、所望のハイブリッドのための選択性の培地（例えば、HAT又はAH）中で繁殖される。要求される結合特異性を有する抗体を分泌するクローンは、L-セレクトイン又はそのフラグメントに結合する能力についてトリオーマ培養培地を検定することにより同定される。所望の特異性を有するヒト抗体を産生するトリオーマは、限定希釈法によりサブクローン化され、そして培養培地中でインビトロにて増殖される。次いで、得られたトリオーマセルラインは、L-セレクトイン又はそのフラグメントに結合する能力について検定される。

トリオーマは、遺伝学的には安定であるけれども、それらは非常に高いレベルでは抗体を産生しない。発現レベルは、トリオーマからの抗体遺伝子を1以上の発現ベクター

中にクローニングし、そしてベクターをセルライン、例えば、組み換え或いはヒト化免疫グロブリンの発現のために前記したセルライン中に形質転換することにより増加されうる。

b. トランスジェニック非ヒト哺乳動物

Ｌーセレクトインに対するヒト抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の少なくとも一つのセグメントをエンコードするトランスジーンを有する非ヒトトランスジェニック哺乳動物から製造されうる。通常、このようなトランスジェニック哺乳動物の内生免疫グロブリン遺伝子座は、機能的に不活性化される。好ましくは、ヒト免疫グロブリン遺伝子座のセグメントは、重鎖及び軽鎖構成成分の再配置されていない配列を含む。内生免疫グロブリン遺伝子の不活性化及び外生の免疫グロブリン遺伝子の導入は共に、標的相同的組み換えにより、又はＹＡＣ染色体の導入により達成される。この方法から得られたトランスジェニック哺乳動物は、免疫グロブリン構成成分配列を機能的に再配列でき、そして、内生の免疫グロブリン遺伝子を発現することなしにヒト免疫グロブリン遺伝子によってエンコードされる種々のイソタイプの抗体のレパートリーを発現できる。これらの性質を有する哺乳動物の製造及び性質は、ロンベルグら、WO 93/12227 (1993) ; クッヒェルラパティー、WO 91/10741 (1991) (これらは、全ての目的のために引用されることにより全体として

本明細書の一部となる) によって詳細に記載されている。トランスジェニックマウスが、特に適している。抗Ｌーセレクトイン抗体は、トランスジェニック非ヒト動物、例えば、ロンベルグやクッヒェルラパティー (前掲) によって記載されたトランスジェニック非ヒト哺乳動物を、Ｌーセレクトイン又はそのフラグメントで免疫することにより得られる。モノクローナル抗体は、例えば、このような哺乳動物からのＢ細胞を、好適なミエローマセルラインに、慣用のコーラーミルス

テイン法を用いて融合することにより調製される。

c. ファージ表現 (display) 法

ヒト抗L-セ렉チン抗体を得るための更なるアプローチは、ヒュースら、サイエンス、246:1275-1281 (1989) によって概説されている通常のプロトコルに従ってヒトB細胞からのDNAライブラリーをスクリーニングすることである。L-セ렉チン又はそのフラグメントに結合する抗体が選択される。次いで、このような抗体 (又は結合性フラグメント) をエンコードする配列がクローン化され、増幅される。ヒュースによって記載されたプロトコルは、ファージ表現技術と組み合わせると更に効率的に変わる。例えば、ドワーら、WO91/17271及びマッカフェルティら、WO92/01047 (これらはそれぞれ、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) 参照。これらの方法において、メンバーが、それらの外表面上に種々の抗体を表

現するところのファージライブラリーが製造される。抗体は、通常、Fv又はFabフラグメントとして表現される。所望の特異性を有する抗体を表現するファージは、L-セ렉チンポリペプチド又はそのフラグメントに対する親和性の増大により選択される。

ファージ表現法の変法において、選択されたネズミ抗体の結合特異性を有するヒト抗体が製造されうる。ウインター、WO92/20791参照。この方法において、選択されたネズミ抗体 (例えば、マウスDREG-200) の重鎖可変領域又は軽鎖可変領域のいずれかが、開始物質として用いられる。もし、例えば、軽鎖可変領域が開始物質として選択されれば、メンバーが同じ軽鎖可変領域 (即ちネズミ開始物質) 及び異なった重鎖可変領域を表現するところのファージライブラリーが構築される。重鎖可変領域は、再配列されたヒト重鎖可変領域のライブラリーから得られる。L-セ렉チンへの強い特異的結合 (例えば、少なくとも 10^8 M^{-1} 、好ましくは少なくとも 10^9 M^{-1}) を示すファージが選択さる。次いで、このファージからのヒト重鎖可変領域が、更なるファージライブラリーを構築するための開始物質として働く。このライブラリーにおいて、各ファージは

、同じ重鎖可変領域（即ち、最初の表現ライブラリーから同定された領域）及び異なった軽鎖可変領域を表現する。軽鎖可変領域は、再配列されたヒト可変軽鎖領域のライブラリーから得られる。再び、L-セレクトインへの強い特異的結合を示すファージが選択される。これら

のファージは、完全にヒトのL-セレクトイン抗体の可変領域を表現する。これらの抗体は、通常、ネズミ開始物質（例えば、マウスDR EG-200）と同じ或いは類似のエピトープ特異性を有する。

使用方法

本発明の抗体は、典型的には、炎症成分、特に好中球又はT細胞により仲介されている炎症成分を伴う病気状態の治療における使用が見いだされる。好ましい用途は、心筋梗塞、大脳虚血状態（例えば、発作）、腎臓の、肝臓の又は脾臓の梗塞形成、脳外科手術、ショック、心臓手術（例えば、冠状動脈バイパス）、選択的血管形成等により引き起こされる虚血-再灌流損傷の治療的或いは予防的処置である。他の好ましい用途は、敗血症、成人呼吸促進症候群、及び多器官不全である。抗体は、外傷、熱傷、凍傷又は脊髄に対する損傷による損傷の治療における使用が見いだされる。抗体はまた、自己免疫疾患（これは例として、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、タイプI糖尿病及びぶどう膜炎を含むが、これらに限定されない）の治療、皮膚の炎症性疾患、例えば乾癬の治療、及び髄膜炎及び脳炎の治療における使用が見いだされる。他の典型的な用途は、器官移植拒絶反応及び移植片対宿主疾患の予防及び治療である。

本発明のいずれの抗体も、他の抗体、特に種々の接着分子と反応性であるヒト化又はヒト抗体と組み合わせて用いられ得る。例えば、適した免疫グロブリンは、CD11a、

CD11b、CD18、E-セレクトイン、P-セレクトイン及びICAM-1に特異的な免疫グロブリンを含む。他の適した抗体は、リンホカイン、例えばIL-1、IL-2及びIFN- γ 、及びそれらのレセプターに特異的な抗体である。

本発明の抗体はまた、化学療法剤と共に与えられる、別々に投与される組成物

としても用いられ得る。典型的には、薬剤は、非ステロイド系抗炎症剤及びコルチコステロイドを含みうるが、医薬の分野の熟練者に良く知られた多くの添加剤（例えば、サイクロスポリン）もまた用いられ得る。実際、本発明の免疫グロブリンは、典型的には、特定の疾患の治療のために本技術分野の熟練者によって現在用いられている薬剤と組み合わせて用いられる。

いくつかの治療方法においては、例えば、抗L-セレクトリン抗体が、血栓溶解剤と組み合わせて用いられる。以前の方法において、急性の心筋梗塞を伴った患者は、しばしば、閉塞した冠状動脈を開放することにより治療される。塞がった冠状動脈の再開放は、閉塞を引き起こす血栓を溶解し、そしてそれによって冠状血流を回復する血栓溶解剤を投与することにより達成されうる。血管の再灌流はまた、閉塞した又は狭窄した冠動脈の部分のバルーン拡張による急性の経皮経管冠動脈拡張術（PTCA）によって達成されうる。しかしながら、冠状血流の回復は、従来の方法においては、虚血-再灌流損傷をもたらす。

本発明の方法において、虚血-再灌流損傷は、血栓溶解

剤又はPTCAを、ヒト化或いはヒト抗L-セレクトリン抗体と組み合わせることにより減少又は予防される。抗体は、通常、血栓溶解剤の投与又はPTCAの開始の前又は同時に予防的に投与される。次いで、抗体の更なる投与量が、しばしば、血栓溶解又は血管形成処理の間又は後に投与される。抗体の予防的投与と、血栓溶解又は血栓形成処置の開始の間隔は、通常、5～30分、好ましくは5～20分、最も好ましくは5～10分である。抗体は、非経口的に、好ましくは静脈内注入により、0.01～10mg/kg体重、好ましくは0.14～5mg/kg及び最も好ましくは0.3～3mg/kgの投与量にて、投与される。抗体は、静脈内ボラス注入として例えば1～5分間にわたって、より少ない投与量の繰り返し注入として、又は一回の静脈内注入として与えられ得る。ボラス注入は、予防的な投与量のために、また緊急の場合に特に有用である。抗体の更なる投与量が、上記と同じ割合にて、急性心筋梗塞の血栓溶解又は血管形成処置の間又は後に、抗体の最適なプラズマレベルを達成するために、繰り返し（例えば、4～6時間毎に）投与されうる。

血栓溶解剤は、直接又は間接的に、インビボで血栓の溶解を刺激する能力を有する薬剤である。血栓溶解剤は、組織プラスミノゲンアクチベーター（ヨーロッパ特許第0093619号公報参照）、アクチバーゼ（act ivase）、アルテプラゼ（alteplase）、デュテプラゼ（duteplase）、シルテプラゼ（si

l teplase）、ストレプトキナーゼ、アニストレプラゼ（anistr eplase）、ウロキナーゼ、ヘパリン、ワルファリン及びクマリンを含む。追加の血栓溶解剤は、サルプラゼ（saruplase）及び吸血こうもりプラスミノゲンアクチベーターを含む。ハリス、プロテイン エンジニアリング 6：449-458（1987）；PCT/EP 90/00194；米国特許第4,970,159号明細書参照。血栓溶解剤は、血栓又はその併発物を部分的に散らす又はそれらの形成を予防するのに十分な量で患者に投与される。これを達成するのに十分な量は、「治療的有效投与量」又は「有効投与量」として定義される。このために有効な量は、病気の重さ、患者の通常の状態、投与経路及び他の薬剤との組み合わせに依存する。しばしば、血栓溶解剤の治療的有效投与量及びこのような薬剤の投与法は、血栓溶解薬の単独での使用のためにFADにより認可されたものの例えば、100mgのアルテプラゼ又は1.5百万単位 of ストレプトキナーゼである。

本発明の好ましい薬学的組成物は、L-セレクチン発現細胞を殺すための、イムノトキシン中での本発明の主体である免疫グロブリンの使用を含む。イムノトキシンは、2つの構成成分によって特徴づけられ、特に、インビトロ又はインビボで選択された細胞を殺すのに有用である。一つの構成成分は、細胞障害剤であり、それは、通常、付着された又は吸収されたときに細胞に対して致死的である。第

二も構成成分は、「デリバリービヒクル」として知られており、特定の細胞タイプ、例えばL-セレクチンエピトープを発現している細胞に、毒性の薬剤をデリバリーする手段を提供する。2つの構成成分は、通常、種々の良く知られた化学

的方法のいずれかにより、互いに化学的に結合されている。例えば、細胞障害剤が蛋白質でありかつ第二の構成成分が完全な免疫グロブリンである場合は、結合は、ヘテロ二価性の架橋物質、例えば、SPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等である。種々のイムノトキシンの製造は、本技術分野で良く知られており、例えば、「モノクローナル抗体-毒素コンジュゲート：不思議な弾丸を狙って」トルペら、*Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, アカデミック プレス、第168-190頁(1982) (これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) 中に見ることができる。構成成分はまた、遺伝子的に連結されうる(チャウダリーら、*ネーチャー* 339:394 (1989) (これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) 参照)。

種々の細胞障害剤が、イムノトキシンの使用に適している。細胞障害剤は、放射性核種、例えば、ヨウ素-131或いは他のヨウ素のアイソトープ、イットリウム-90、レニウム-188及びビスマス-212或いは他の α エミッター、多くの化学療法剤、例えば、ビンデシン、メソト

レキセート、アドリアマイシン及びシスプラチン、及び細胞障害蛋白質、例えば、リボソーム阻害蛋白質様ボークウィード抗ウイルス蛋白質、シュードモナスエキソトキシンA、リシン、ジフテリア毒素、リシンA鎖等、又は細胞表面で活性な剤、例えばホスホリパーゼ酵素(例えば、ホスホリパーゼC)を含みうる(一般に、共通に譲渡された米国特許出願シリアル番号07/290,968号明細書、「キメラ毒素」オルスネス アンド フィル、*Pharmac. Ther.*、25:355-381 (1982)、及び癌の検出及び治療のためのモノクローナル抗体(バルドウィンとバイエルズ編、アカデミック プレス、1985)、159-179頁、224-226頁(これらは全て、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) 参照)。

イムノトキシン中のデリバリー成分は、本発明の免疫グロブリンを含む。完全な免疫グロブリン又はそれらの結合性フラグメント、例えば、Fab又はFvが

好ましく用いられる。典型的には、イムノトキシン中の抗体は、ヒトIgM又はIgGイソタイプであるが、他の哺乳動物定常領域が、所望により用いられ得る。

本発明の抗体及びそれらの薬学的組成物は、特に、非経口投与、即ち、皮下、筋肉内又は静脈内投与において有用である。本発明の抗体はまた、典型的には局所適用のために、胃瘻栄養法又は（胃）洗浄、腹腔内注入、眼軟膏剤、局所軟膏剤、頭蓋内注入（典型的には、脳室中に）、心膜

内注入、又は内包（intrabursal）注入によって投与されうる。非経口投与のための組成物は、通常、許容される担体、好ましくは水性担体中に溶解された免疫グロブリンの溶液又はその混液を含む。種々の水性担体、例えば、水、緩衝水、リン酸塩緩衝生理食塩水（PBS）、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、ヒトアルブミン溶液等が用いられ得る。これらの溶液は、無菌であり、そして一般的には微粒子物質が存在しない。これらの組成物は、慣用の、良く知られた滅菌方法により滅菌されうる。組成物は、生理学的条件に近づけるために、要求に応じて、薬学的に許容できる補助物質、例えばpH調節及び緩衝化剤、毒性調節剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム及び乳酸ナトリウムを含みうる。これらの製剤中の抗体の濃度は、広範囲に、即ち、約0.005重量%未満（通常は、少なくとも約1重量%）から15又は20重量%と大きい量まで変化することができ、主として、選択された投与の特定の様式に従って、液容量、粘性等に基づいて選択される。

従って、注入のための典型的な薬学的組成物は、1mlの無菌緩衝水、及び1～70mgの免疫グロブリンを含むように作製されうる。静脈内注入のための典型的な組成物は、250mlの無菌リンゲル液、及び150mgの抗体を含むように作製されうる。非経口投与組成物を調製するための現実の方法は、本技術分野の熟練者にとって公知又は明白であり、例えば、レミントンズ ファーマシューター

トン、ペンシルバニア、1980) (これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる) に更に詳細に記載されている。洗浄又はその他のルートのために適した組成物は、意図される特定の使用に従って選択される。いくつかの薬学的組成物は、抗L-セ렉チン抗体及び血栓溶解剤を含む。

本発明の抗体は、貯蔵のため凍結又は凍結乾燥され、使用に先だって適当な担体中で再構成されうる。この技術は、慣例の免疫グロブリンにおいて有効であると知られており、公知の、凍結乾燥及び再構成技術が用いられ得る。凍結乾燥及び再構成が、様々な程度の抗体の活性損失をもたらしうる (例えば、慣例の免疫グロブリン、IgM抗体は、IgG抗体よりも大きい活性損失を生じる傾向にある) ということ、及び使用レベルが、それを補うために調節されなければならないかもしれないということは、本技術分野の熟練者にとって認識されることである。

本発明の抗体又はそれらの混液を含む組成物は、予防的な及び/又は治療的な処置のために投与されうる。治療的な適用において、組成物は、既に炎症性疾患に罹っている患者に、疾患及びその合併症を治すのに又は少なくとも部分的に阻止するのに十分な量で投与される。このことを達成するのに十分な量は、「治療的有效投与量」として定義される。この使用のために有効な量は、疾患の重大度及び患者時自身の免疫系が通常の状態に依存するが、一般的に

は、一投与当たり約1～約200mgの抗体の範囲が、更に普通には患者当たり5～70mgの投与量が用いられる。投与計画は、疾患の状態及び患者の状態により変化し、典型的には、一回のボラス投与量又は連続注入から、一日当たりの多重投与 (例えば、4～6時間毎) まで多岐にわたり、又は処置医及び患者の状態によって示されたように変化する。本発明の物質は、一般に重大な疾患状態、即ち生命が脅かされている又は脅かされる可能性のある状況にて用いられ得るということが考慮されなければならない。このような場合において、外来物質の最少化及び本発明の免疫グロブリンによって成される「異種物質」拒絶反応のより少ない蓋然性のために、このような抗体を実質的に過剰に投与することが可能

でありそしてそれが望ましいと処置医により感じられるかもしれない。

予防的な適用において、本発明の抗体又はそれらの混液を含む組成物は、まだ特定の疾患に罹っていない患者に、患者の抵抗力を高めるために投与される。このような量は、「予防的有効投与量」と定義される。この使用において、正確な量は、再び、患者の健康状態及び通常の免疫性レベルに依存するが、一般には、一投与当たり1～70mgの範囲である。好ましい予防的使用は、敗血症又は外傷に既に罹った患者においての成人呼吸促進症候群の予防、器官移植拒絶反応の予防、及び虚血に罹った患者における再灌流損傷の予防のための使用である。重大な病気の患者において、投与当たりヒト化又はヒト免疫グロブリンの約50

～150mgの投与量がしばしば用いられ、そして、より大きい投与量が示されうる。

組成物の単一の或いは多重の投与が、処置医によって選択された投与量レベル及びパターンで行われうる。どんな場合であっても、薬学的製剤は患者を効果的に処置するのに十分な本発明の抗体量を提供すべきである。

本発明の抗体は更にインビトロでの広範囲の有用性が見いだされる。例として、抗体は、L-セレクトリン抗原の検出のため、特定の白血球の単離のため、又はその他のために用いられ得る。例えば、これには限定されないが、ヒト化DREG-200免疫グロブリンを固定化し、そしてL-セレクトリン抗原を有する血液細胞を除くために患者から血管外に取り出された血液と接触させることができ、そして残った血液（これは、L-セレクトリン保持細胞が枯渇させられている）は患者中に再導入されうる。患者中に再導入された枯渇血液中に残ったヒト化抗体（例えば、固定化支持体からの脱着の結果として）は、ネズミ抗体に比べて、抗原性が減少されているか又は無視できる。

診断目的にため、抗体はラベルされるか又はラベルされないかのいずれかであり得る。ラベルされていない抗体は、ヒト化又はヒト抗体と反応性である他のラベルされた抗体（第二抗体）、例えばヒト免疫グロブリン定常領域に特異的な抗体と共に用いられ得る。或いは、抗体は、直接に、ラベルされうる。広範囲のラベル、例えば、放射性核種、蛍光色素、酵素、酵素基質、酵素コファクター、酵

素阻害

剤、リガンド（特に、ハプテン）等が用いられ得る。多くのタイプのイムノアッセイが可能であり、それらは本技術分野の熟練者にとって良く知られている。

以下の実施例は、説明のために提供されるものであり、限定のためではない。実施例はマウスDREG-200抗体に関するけれども、L-セレクトリンに対する高い結合親和性を有するヒト化抗体を製造することはまた、マウスDREG-55、マウスDREG-56、又はL-セレクトリンのエピトープに結合する他のモノクローナル抗体からのCDRを用いて達成されうることが理解されよう。

実施例

実施例1 重鎖及び軽鎖cDNAのクローニング

マウスDREG-200の重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子のcDNAを、（
コラ、J. Immunol. 148:1149（1992）及び共通に譲渡され
た米国特許出願シリアル番号第07/634, 278号明細書参照）に記載の如
くのアンカーされたポリメラーゼ連鎖反応を用い、定常領域にハイブリダイズさ
れかつHind III 部位を含む3' プライマー、及びdG尾部にハイブリダイズ
されかつEcoRI部位を含む5' プライマーを用いてクローン化した。PCR
増幅されたフラグメントは、EcoRI及びHind III で消化され、配列決定
のためにpUC18ベクター中にクローン化された。マウスDREG-200に
関し、少なくとも2つのガンマー1特異的クローン及び少な

くとも2つのカッパ特異的クローンが配列決定された。ガンマー1クローン及び
カッパクローンは、それぞれ、配列が同一である。cDNA可変ドメイン配列及
び導かれるアミノ酸配列を図1に示す。

実施例2 ヒト化抗体のコンピューターモデリング

ヒト化抗体中で高い結合親和性を保持するために、クイーンらの一般的方法に
従った（クイーンら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:
10029（1989）及びWO90/07861、（これらは、全ての目的の
ために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）参照）。受容体

ヒト抗体が元のネズミ供与体抗体と相同であればあるほど、ネズミCDRをヒトフレームワークと組み合わせることが親和性を減少しうる歪みをCDR中に導入することになるということがより少ないと見込まれる。ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワーク及び供与体免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワーク間において、少なくとも65%の相同性（即ち、配列同一のパーセント）が好ましい。標準的には、同じヒト抗体からの重鎖及び軽鎖が、フレームワーク配列を提供するために選択されて、2つの鎖の集合における非相容性の可能性を減少させる。NBRF蛋白質配列データベースに対する配列相同検索に基づいて（MicroGenie 配列分析ソフトウェア（バックマン）を用いて行った）、抗体Euが、マウスDREG-200のヒト化のためのフレームワーク配列を提供するために選ばれた。

コンピュータープログラムENCAD（レビット、J. Mol. Biol. 168:595（1983）、これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）を、マウスDREG-200可変領域のモデルを構築するために用いた。モデルは、CDRと潜在的に相互作用するのに十分にCDRに近似したところの、マウスDREG-200フレームワーク中のアミノ酸を決定するために用いた（下記のカテゴリー4）。ヒト化軽鎖及び重鎖DREG-200可変領域をデザインするために、各位置において、その位置が下記の5つのカテゴリーの1以上に合致しなければ、アミノ酸はEu抗体中と同じであるように選択された。

- （1）位置がCDRの範囲内にあった、
- （2）Euアミノ酸がその位置においてヒト抗体にとって異常であり、一方、マウスDREG-200アミノ酸は、その位置においてヒト抗体にとって典型的であった、
- （3）位置がCDRのすぐ近くにあった、
- （4）上記したモデルが、アミノ酸が抗原結合領域（CDR）に物理的に近接しているかも知れないということを示していた。

これらのカテゴリーにはいる位置のために、マウスDREG-200抗体から

のアミノ酸が用いられた。

更に、もしも下記(5)なら、位置が第5のカテゴリー内にあった。すなわちもし、

(5) E u アミノ酸がその位置においてヒト抗体にとっ

て非常に異常であり、そして、マウスDREG-200アミノ酸は異なり、しかしまた異常であるならば、そのときは、その位置においてヒト抗体にとって典型的なアミノ酸が用いられた。

各カテゴリー中のアミノ酸を、表1に示す。いくつかのアミノ酸は、2以上のカテゴリーに入りうる。ヒト化DREG-200軽鎖及び重鎖可変ドメインの最終の配列を、ネズミDREG-200と比較して、図2に示す。

表 1

カテゴリー	軽 鎖	重 鎖
1	24-40, 56-62, 95-103	31-35, 50-66, 99-110
2	87	93, 95, 98, 111, 112, 115
3	--	30, 98, 111
4	54, 66, 76, 93	27, 30, 48, 72
5	--	113

ヒト化抗体のための遺伝子を構築するために、ヒト化重鎖及び軽鎖の蛋白質配列をエンコードし、シグナルペプチドを含み、一般的にはマウス配列中で見られるコドンを利用しているヌクレオチド配列を選択した。いくつかの同義性コドンを、制限部位を作製するために又は望ましくない制限部位を除くために変更した。遺伝子のヌクレオチド配列はまた、各末端にスプライス供与体シグナル及びXba

I部位を含む。ヌクレオチド配列及びエンコードされたヒト化軽鎖及び重鎖可変ドメインを図3に示す。各遺伝子は、(コラ、J. Immunol. 148: 1149 (1992) 及び共通に譲渡された米国特許出願シリアル番号第07/6

34, 278号明細書（これらは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる）参照）の記載の如くに、4つのオーバーラップ合成オリゴヌクレオチドから構築した。次いで、重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子は、それぞれ、pvg1-dhfr又はpvk発現ベクター（共通に譲渡された米国特許出願シリアル番号第07/634, 278号明細書参照）のXbaI部位中に、完全な重鎖又は軽鎖遺伝子を製造するのに適した方向にリゲートされた。反応は、本技術分野において良く知られた条件下で行った（マニアティス、前掲）。

重鎖及び軽鎖プラスミドを、エレクトロポレーションによりSp2/0マウスミエローマ細胞中にトランスフェクトし、そして細胞をgpt発現に関して選択した。クローンを、ELISAにより培養上澄み液中のヒト抗体生産を検定することによりスクリーニングし、そして抗体を最良の生産性クローンから精製した。次いで、ヒト化DREG-200 IgG1抗体は、組織培養上澄み液を、スタビロコッカスプロテインA-セファロースCL-4B（ファルマシア）のカラムに通すことにより精製された。結合した抗体を、0.2Mグリシン-HCl、pH3.0で溶出し、1Mトリス、pH8.0で中和した。PD10カラム

（ファルマシア）に通すことにより又は透析により緩衝液をPBSに交換した。抗体をより高いレベルで生産する細胞を得るために、トランスフェクトされたクローンを、増大する種々の濃度のメソトレキセート中で培養することができる。

IgG4イソタイプのヒト化DREG-200抗体を製造するために、他のベクターpVg4-dhfrを最初に構築した。そうするために、 γ 1定常領域を含むpvg1-dhfrのXbaI-BamHIフラグメントを、ポリメラーゼ連鎖反応を含む本技術分野の熟練者に良く知られた方法を用いて、 γ 4遺伝子のC_H1エキソンの前のHind III部位からその遺伝子のC_H4エキソンに続くNsi Iの270bp後ろまで及んでいるヒト γ 4定常領域遺伝子の約2000bpのフラグメント（エリソン アンド フード、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1984 (1982)）で置き換えた。次いで、ヒト化DREG-200重鎖可変領域遺伝子を、pvg4-dhfrのXbaI部位

中にクローン化した。次いで、この重鎖プラスミドを、上記の軽鎖プラスミドと共にSp2/0細胞中にトランスフェクトし、クローンを選択し、そしてヒト化DREG-200 IgG4抗体を、IgG1抗体のために上記した如くに精製した。

実施例3 ヒト化抗体の性質

ヒト化DREG-200抗体のL-セレクトインに対する

親和性を、放射性ヨウ素ラベルしたマウスDREG-200抗体との競合により測定した(図4)。結合親和性は、ベルゾフスキの方法(J. A. ベルゾフスキ アンド I. J. ベルコワー、基礎免疫学(W. E. ポール編)、ラベンプレス(ニューヨーク)、595(1984)、これは、全ての目的のために引用されることにより全体として本明細書の一部となる)に従って計算された。ヒト化DREG-200抗体は、マウスDREG-200抗体の約2倍以内の親和性を有していた。同様な結果が、ヒト好中球上のL-セレクトインに対する親和性を測定したときに見られる。

マウス及びヒト化DREG-200抗体の、内皮細胞へのヒト好中球の接着をブロックする能力を、ハルマンら、Biochem. Biophys. Res. Comm. 174:236(1991)の検定方法の改良法を用いて測定した。詳しくは、ヒト臍帯内皮細胞(HUVEC、クロネティクス、サンディエゴより)は、Lab-Tek 8-チャンバースライド(ヌンク、ナバービル、IL)中にて、EGM培地(クロネティクス)中で、密集成長まで成長した。HUVEC細胞は、使用に先立ち、20 ng/mlのIL-1 β (R&Dシステム、ミネアポリス、MN)で4時間刺激された。好中球を、密度勾配遠心分離により、デキスロラン沈降により赤血球が除かれた軟層から単離し、次いで、ml当たり10⁷に調製した。好中球(100 μ l)を、種々の濃度の抗体(100 μ lのRPMI中)と

共に、氷上で20分間予備インキュベートした。HUVECスライドを洗浄しIL-1 β を除き、そして4℃にて、ロータリーシェーカー(100 rpm)上に

置いた。未処理の又は抗体処理した好中球をチャンバーに加え、そしてスライドを30分間シェーカー上で4℃にてインキュベートした。次いで、スライドを10回RPMIの入ったビーカー中にさっと浸すことにより洗浄し、RPMI中の1%グルタルアルデヒドで固定化し、そして風乾させた。好中球接着は、顕微鏡を用いて、内皮細胞の単一層の所定の面積に接着した好中球の数を数えることにより定量した。図5に示された如く、ヒト化IgG1及びマウスDREG-200抗体は共に、HUVECへの好中球の結合を有効にブロックし、一方、関連性のない対照の抗体はブロックしなかった。ヒト化DREG-200 IgG4抗体は、同様に、内皮細胞への好中球の結合をブロックする。

実施例4 再灌流に引き続いて起こる心筋損傷におけるhuDREG-200の効果

再灌流に引き続いて起こる心筋虚血組織の実際の救済度合いにおけるIgG4イソタイプのヒト化DREG-200 (hu DREG-200) の効果を調べた。大人の雄ネコ(2.8~4.2kg)に、ナトリウムペントバルビタール(30mg/kg、i.v.)を用いて麻酔をかけた。気管内カニユーレを正中切開を通して挿入し、そしてネコを間欠的陽圧換気(ハーバード スモール アニマル

レスピレーター、ドーバー、MA)においた。麻酔の手術計画を維持するための追加のペントバルビタール注入のため及び抗体の投与のために、ポリエチレンカテーテルを右外頸静脈中に挿入した。圧力変換器(コーベ インストルメント、レークウッド、CO)を介しての平均の動脈血圧(MABP)の測定のために、もう一つのポリエチレンカテーテルを左大腿動脈を通して挿入し、腹部大動脈中に配置した。胸骨中央(midsternal)開胸術の後、前方心膜を切り、そして左前方下行性(LAD)の冠状動脈の周りに、その起点から8~10mm、3-0の絹糸縫合を施した。高性能のカテーテルチップ圧力変換器(モデルMPC500、変換器制御ユニット モデルTCB500を装備、ミラー インストルメンツ インク、ヒューストン、TX)を、先端のくぼみを通して左心室中に導入した。カテーテルを、LV圧及びdP/dt波形の観察を介して配置

し、次いで、絹糸縫合により所定位置に固定した。スカラー心電図 (ECG) の標準導線 II を、心拍数 (HR) 及び ST-セグメント上昇を測定するために用いた。ST-セグメント上昇は、20 分ごとに 50 mm/秒で ECG 記録を分析することにより決定した。ECG、MABP、LVP 及び dP/dt は、ヒューレット-パッカード 78304 A ユニット (ヒューレット-パッカード、パロアルト、CA) にて連続的にモニターし、そしてグルド オシログラフレコーダー (グルド インク、クリーブランド、OH) に、20 分ごとに記録した。圧-速

度インデックス (PRI)、即ち、心筋酸素要求の近似値は、MABP 及び HR の積を 1000 で割って出た値として計算した。

全ての外科的手順を完了した後、ネコを 30 分間放置して安定化させた。その時点で、ECG、MABP、LVP 及び dP/dt のベースライン読みとりを記録した。心筋虚血 (MI) は、LAD の周囲の最初に配置した可逆的な結紮糸を締め、血管を完全に閉塞することにより誘発した。このときを、時間点 0 と表す。2 mg/kg 体重の hu DREG-200 (IgG4 イソタイプ) 又は対照の MA b hu ABL-364 (即ち、イソタイプが同じであるヒト化対照 IgG4 MA b) を、冠状閉塞の 80 分後 (即ち、再灌流の 10 分前、R) にボラスとして非経口的に与えた。10 分後 (即ち、全体として 90 分の虚血後、I)、LAD 結紮糸を緩め、虚血心筋を 4.5 時間再灌流させた。

ネコを、ランダムに 3 つの主要なグループに分けた。6 匹の偽の MI+R ネコに hu DREG-200 (2 mg/kg) を与え、6 匹の MI+R ネコに対照 MA b hu ABL-364 (2 mg/kg) を与え、そして 6 匹の MI+R ネコに hu DREG-200 (2 mg/kg) を与えた。偽の MI+R ネコは、MI+R ネコと同じ外科手順を行ったが、但し LAD 冠状動脈は閉塞されなかった。

4.5 時間の再灌流の期間の終わりに、LAD の周囲の結紮糸を再び締めた。20 ml の 0.5% エバンスブルー

を速やかに左心室に注入して、開放された冠状動脈によって灌流された心筋の領域を染色した。危険にある領域は、染色されないことにより決定した。この注入に引き続き直ぐに、心臓を素早く切除し、暖めた、酸素化されたK-H溶液中に置いた。左回旋(LCX)かつLADの冠状動脈を、引き続く冠状リング血管活性及びPMN接着の研究のために単離除去した。右心室、巨大血管及び脂肪組織を注意深く除き、そして左心室を、3mm厚の切片にて、冠状溝に対して平行にスライスした。心筋層の染色されていない部分(即ち、全危険領域又は虚血領域)を、心筋層のエバンスブルーで染色された部分(即ち、非危険領域又は非虚血領域)から分離した。危険領域を小さな立方体中に分けし、リン酸塩溶液中の0.1%ニトロブルーテトラゾリウム中で、pH7.4及び37℃にて、15分間インキュベートした。テトラゾリウム染料は、活性なデヒドロゲナーゼ及びそれらのコファクターを含む心筋細胞の存在下で、青いホルマジン複合体を形成する。不可逆的に損傷された又は壊死した危険にある心筋層部分(これは染色されない)を、心筋層の染色された部分(即ち、虚血領域だが非壊死領域)から分離した。次に、心筋層の3つの部分(即ち、非虚血組織、虚血非壊死組織、及び虚血壊死組織)の重量を量った。結果は、壊死心臓組織領域の、危険領域又は全左心室質量のいずれかに対するパーセントとして表した。

これらの判断基準の両者に従って、心臓組織の損傷は、

h u DREG-200で処置されたネコにおいて、著しく減少した($p < 0.001$)。危険な心筋層の約30%が対照抗体で処置されたグループにおいては壊死組織へと発展したのに対し、h u DREG-200で処置されたグループにおいては壊死組織の量は15%未満であり($p < 0.01$)、50~60%の減少である。図6を参照。2つの虚血グループ間で、全左心室に対するパーセントとして表された危険領域の含水重量の著しい違いは無く、このことは、心筋虚血の似たような領域が2つのグループで起こったことを示している。それ故、h u DREG-200は、再灌流損傷に対して、著しい保護を示す。

h u DREG-200による虚血組織の注目すべき保護は、プラズマクレアチンキナーゼ活性(これは、心筋損傷の生化学的なマーカーである)の測定から

更に説明される。動脈の血液サンプル (2 ml) を、結紮前及びその後の1時間毎に速やかに抜き取った。血液は、200 IUのヘパリンナトリウムの入ったポリエチレンチューブ中に集めた。サンプルを、2000×g、4℃にて、20分間遠心分離し、そしてプラズマを生化学的検定のためにデカントした。プラズマ蛋白質濃度を、ゴルナルら、J. Biol. Chem. 177:751-766 (1949) のビュレット法を用いて検定した。プラズマクレアチンキナーゼ (CK) 活性は、ロザルキ、J. Lab. Clin. Med. 69:696-705 (1967) の方法を用いて測定し、IU/μg蛋白質で表した。

hu DREG-200を与えた偽のMI/Rネコでは、プラズマCK活性は、6時間の観察期間を通じて僅かに増加し、 3.8 ± 0.9 IU/μg蛋白質の最終値に達した。2つの虚血グループでは、プラズマCK活性は、心筋虚血の期間中僅かに増加した。hu ABL-364を与えたネコでは、循環血液中のCK活性は、再灌流後の最初の30分以内に著しく増加し、再灌流の引き続く4時間の間更に増加した。これとは対照的に、hu DREG-200で処置された虚血ネコは、hu ABL-364を与えた虚血ネコに比べて、著しく低いプラズマCK活性を示した ($p < 0.05$)。効果は全再灌流期間にわたって維持され、これは更に、心筋再灌流損傷に対しての実質的な保護が、hu DREG-200によって与えられることを証明している。

実施例5 心臓機能における hu DREG-200 の効果

心臓機能における hu DREG-200 (IgG4 イソタイプ) の効果を、左心室圧 (LVP) 及びLVPの一時導函数である、最大dP/dt (心筋収縮性のインデックス) を測定することにより決定した。データは、左心室腔中に挿入されたカテーテルチップ血圧計から得た。前記の実施例において議論したネコの3つのグループは全て、これらの心臓変数について比較可能な初期値を示した。偽のMIグループでは、全6時間の実験期間にわたり、最大

dP/dtにおいて著しい変化はなかった。しかしながら、両方のMI/Rグループでは、最大dP/dtは、LADの閉塞の直ぐ後に、約65%まで減少した

。h u A B L - 3 6 4 が与えられたネコでは、収縮性は著しく回復しなかった。しかしながら、h u D R E G - 2 0 0 で処置されたM I - R ネコでは、最大 $d P / d t$ は、再灌流後3時間で対照値まで回復した。従って、再灌流の4.5時間後では、h u A B L - 3 6 4 で処置されたネコの最大 $d P / d t$ は、h u D R E G - 2 0 0 で処置されたネコに比べて著しく低かった ($p < 0.01$)。これらの結果は、h u D R E G - 2 0 0 が、虚血心筋層の再灌流に引き続く心筋の壊死を減少させるばかりでなく、この心筋の救済がまた心臓の機械的性能の改善にも及んでいることを示している。

前記から、本発明の免疫グロブリンは他のL-セレクトイン特異的抗体に比べ非常に多くの利点を提供するということが認められる。マウスモノクローナル抗体と比べて、本発明の免疫グロブリンはより経済的に製造されることができ、かつ実質的により少ない異種アミノ酸配列を含む。ヒト患者に注入されたのちの抗原性のこの減少された可能性は、著しい治療上の改善を示す。

上記において引用された全ての文献及び特許出願は、個々の文献又は特許出願が、明確にそして個々に、引用されることにより一部となると示されているのと同じ程度において、全ての目的のために引用されることにより全体とし

て本明細書の一部となる。本発明は、明確化及び理解の目的のために、説明及び実施例により詳細に記載されているけれども、ある種の変更及び改良は、添付する請求の範囲の範囲内で行われうるということは明白である。

【図1A】

```

          30                                60
ATGGAATCAGACACCCAGGTCCTCATGTTTCTTCTGCTCTGGGTATCTGGTGCCTGTGCA
M E S Q T Q V L M F L L L W V S G A C A

          90                                120
GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATGTCAGTAGGACAGAAGGTCACT
D I V M T Q S P S S L A M S V G Q K V T

          150                                180
ATGACCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAGCAATCAAAAGAACTATTTGGCC
M T C K S S Q S L L N S S N Q K N Y L A

          210                                240
TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGTCTCCTAAACTTCTGGTATACTTTGCATCCACTAGG
W Y Q Q K P G Q S P K L L V Y F A S T R

          270                                300
GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACC
E S G V P D R F I G S G S G T D F T L T

          330                                360
ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTCACCAACATTATAGCACT
I S S V Q A E D L A D Y F C H Q H Y S T

          390
CCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
P L T F G A G T K L E L K

```

【図1B】

```

          30                                60
ATGGAATGGAGTTGGATATTTCTCTTTCTCCTGTCAGGAAGTGCAGGTGTCCACTCTGAG
M E W S W I F L F L L S G T A G V H S E

          90                                120
GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCC
V Q L Q Q S G P D L V K P G A S V K M S

          150                                180
TGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCT
C K A S G Y T F T S Y V M H W V K Q K P

          210                                240
GGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTTATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAAT
G Q G L E W I G Y I Y P Y N D G T K Y N

          270                                300
GAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y M

          330                                360
GAGCTCAGCAGCTTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGGGAGGAGTAT
E L S S L T S E D S A V Y Y C A R E E Y

          390                                420
GGTAACTACGTTCCGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
G N Y V R Y F D V W G A G T T V T V S S

```

1	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	A	M	S	V	G	Q	K	V	T
1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
21	M	T	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A
21	I	T	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A
41	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	V	Y	F	A	S	T	R
41	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	V	Y	F	A	S	T	R
61	E	S	G	V	P	D	R	F	I	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
61	E	S	G	V	P	D	R	F	I	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
81	I	S	S	V	Q	A	E	D	L	A	D	Y	F	C	H	Q	H	Y	S	T
81	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	F	C	H	Q	H	Y	S	T
101	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K							
101	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	V	K							

[illegible]

【図3A】

```

      10      20      30      40      50      60
TCTAGACCACCATGGTTTTTCACACCTCAGATACTTGGACTTATGCTTTTTTGGATTTCAG
      M V F T P Q I L G L M L F W I S

      70      80      90      100     110     120
CCTCCAGAGGTGACATTGAGATGACACAGTCTCCATCCACTCTGAGTGCATCAGTAGGAG
A S R G D I Q M T Q S P S T L S A S V G

      130     140     150     160     170     180
ATCGTGTCACTATTACATGTAAGAGCTCACAGAGCCTTTTAAATAGTAGCAATCAAAAGA
D R V T I T C K S S Q S L L N S S N Q K

      190     200     210     220     230     240
ACTATTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGAAAGGCACCTAAGCTTCTGGTATACTTTG
N Y L A W Y Q Q K P G K A P K L L V Y F

      250     260     270     280     290     300
CATCCACTAGGGAATCTGGAGTCCCTGATCGCTTCATAGGTAGTGGATCTGGTACAGATT
A S T R E S G V P D R F I G S G S G T D

      310     320     330     340     350     360
TCACTCTTACCATCAGCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTTGCAACATACTTCTGTCAACCAAC
F T L T I S S L Q P E D F A T Y F C H Q

      370     380     390     400     410     420
ATTATAGCACTCCGCTCACGTTCCGGTCAAGGTACTAAGGTAGAAGTCAAGCGTAAGTACA
H Y S T P L T F G Q G T K V E V K

      430
CTTTTCTAGA

```

【図3B】

```

      10      20      30      40      50      60
TCTAGACCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGSTG
      M G W S C I I L F L V A T A T G

      70      80      90      100     110     120
TCCACTCCCAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAAGTCAAGAAACCTGGGAGCTCAG
V H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S

      130     140     150     160     170     180
TGAAGGTATCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTATGCACTGGGTGA
V K V S C K A S G Y T F T S Y V M H W V

      190     200     210     220     230     240
GACAGGCACCTGGTCAAGGACTCGAGTGGATTGGATATATTTATCCTTACAATGATGGTA
R Q A P G Q G L E W I G Y I Y P Y N D G

      250     260     270     280     290     300
CCAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCCGAGTCACAATTACTTCAGACGAGTCCACTAACA
T K Y N E K F K G R V T I T S D E S T N

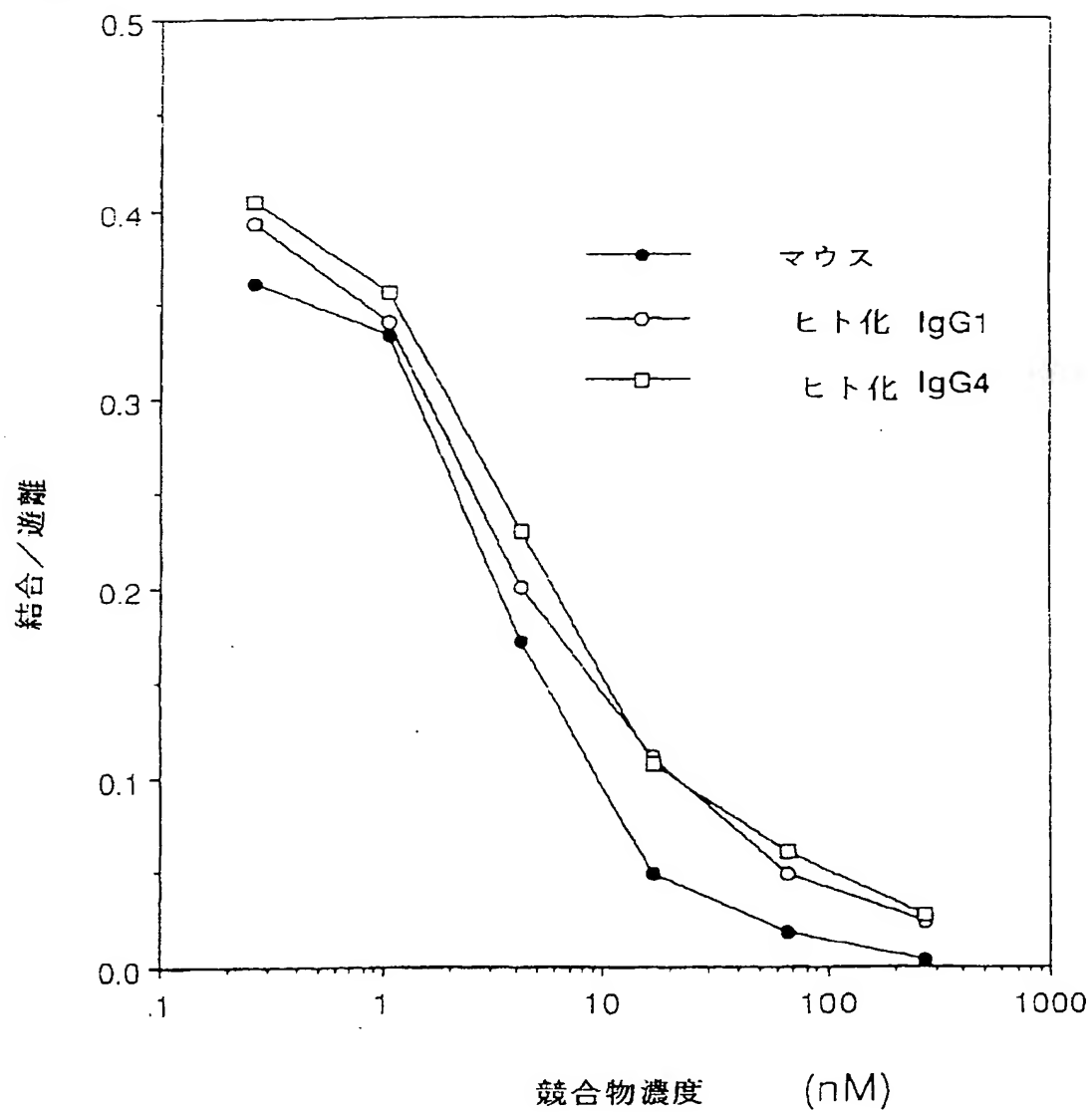
      310     320     330     340     350     360
CAGCCTACATGGAAGTCAAGCAGCTTGCATCGGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAA
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A

      370     380     390     400     410     420
GGGAGGAGTATGGTAACTACGTTCCGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCA
R E E Y G N Y V R Y F D V W G Q G T L V

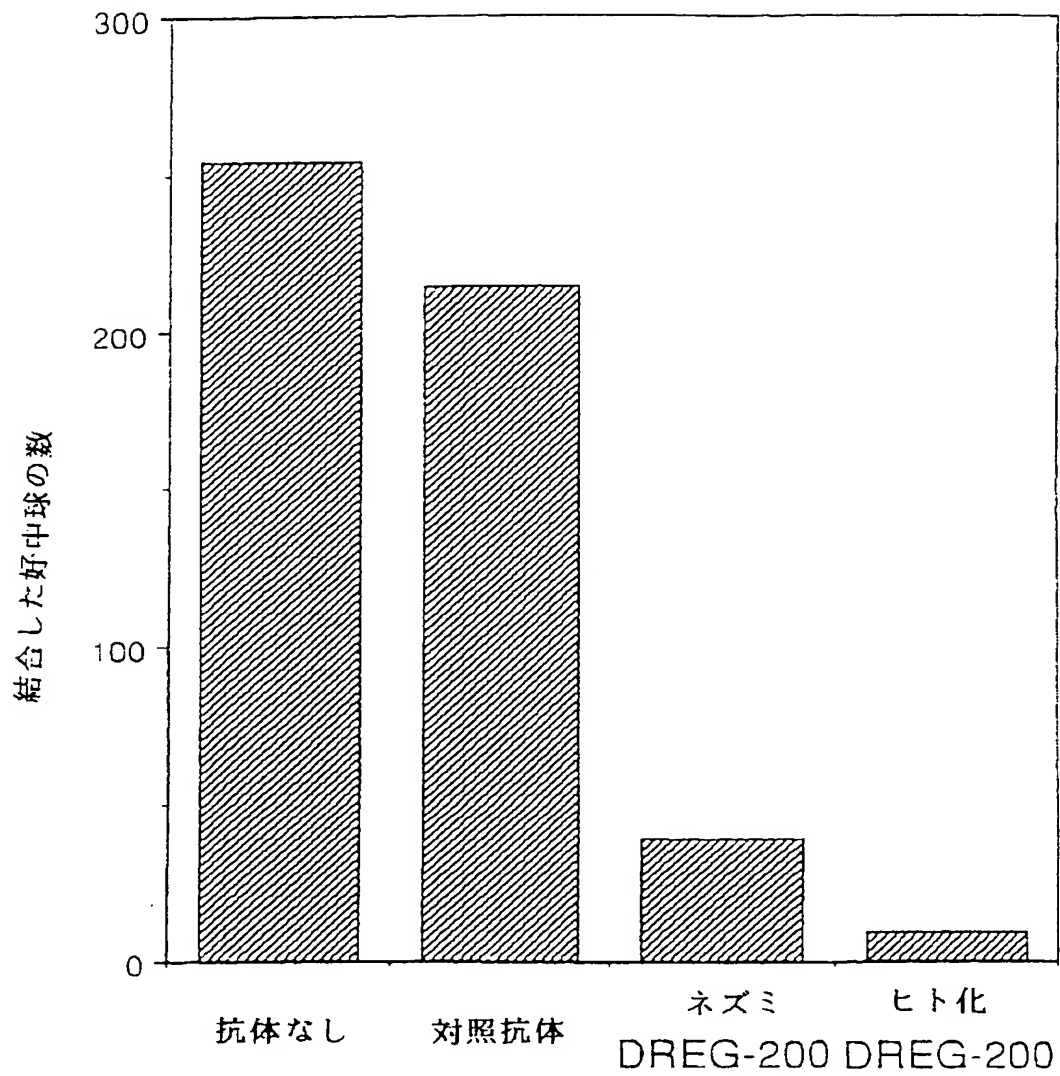
      430     440     450
CAGTCTCCTCAGGTGAGTCCTAACTTCTAGA
T V S S

```

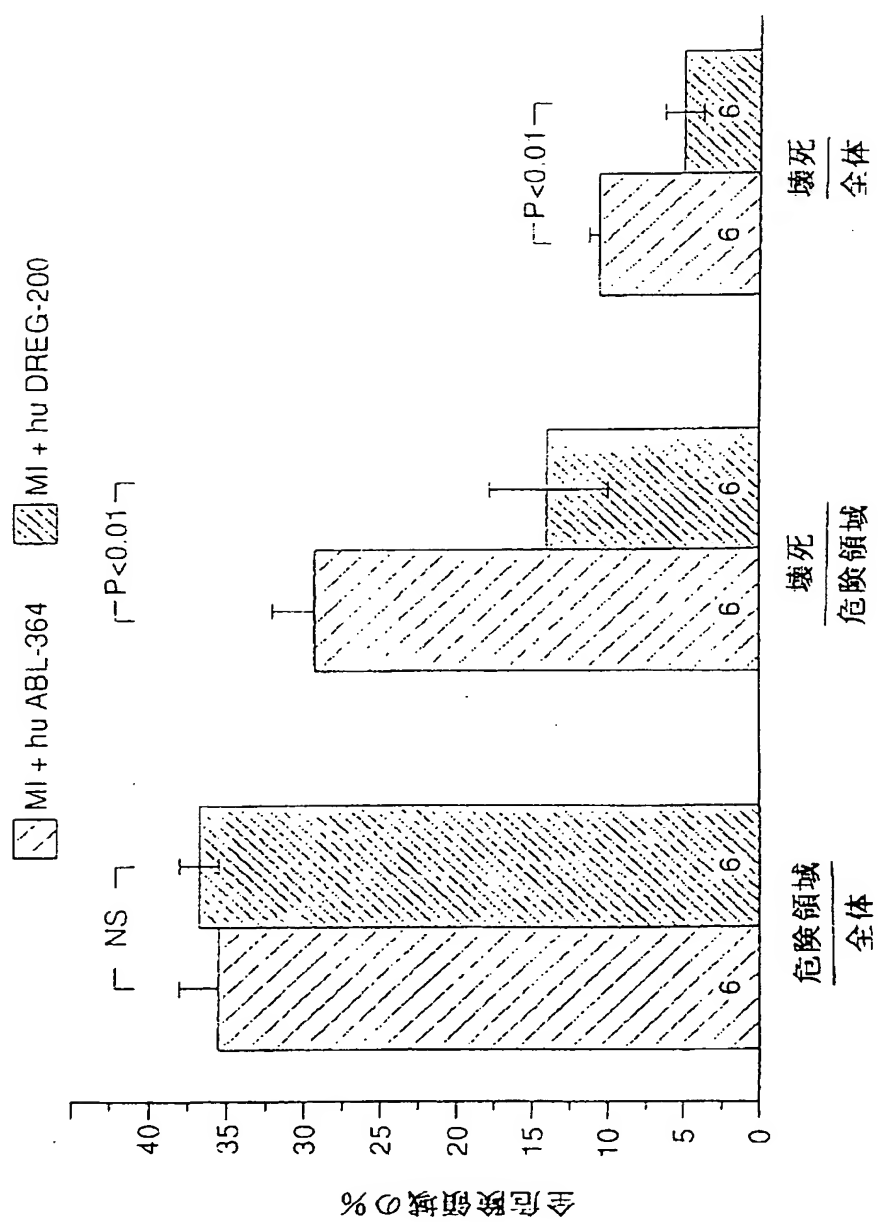
【図4】



【図5】



【図6】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/11612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) : A61K 39/395; C07K 15/28; C12N 15/13; C12P 21/08

US CL : 424/85.8; 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.22, 388.7

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/85.8; 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.22, 388.7

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, DIALOG, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, PI

search terms: L-selectin, LAM, chimeric, humanized, Co, Drug-200

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y, P	TIBTECH, Volume 11, issued February 1993, W.J. Harris et al., "Therapeutic Antibodies - The Coming of Age", pages 42-45, see entire document.	1-29
Y	Proc. Natl. Acad. Sci., Volume 87, issued March 1990, T.K. Kishimoto et al., "Identification of a Human Peripheral Lymph Node Homing Receptor: A Rapidly Down-Regulated Adhesion Molecule", pages 2244-2248, see entire document.	1-29
Y	Immunol. Reviews, Volume 114, issued May 1990, T.M. Carlos et al., "Membrane Proteins Involved In Phagocyte Adherence To Endothelium", pages 5-25, see entire document.	1-29

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

Special categories of cited documents:		"T"	later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E"	earlier document published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"A"	document member of the same patent family
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

13 January 1994

Date of mailing of the international search report

09 FEB 1994

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. NOT APPLICABLE

Authorized officer

PHILLIP GAMBEL

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/11612

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Blood, Volume 78, No. 3 issued 01 August 1991, T.K. Kishimoto et al., "Antibodies Against Human Neutrophil LECAM-1 (LAM-1/Leu-8/DREG-56 antigen) And Endothelial Cell ELAM-1 Inhibit A Common CD18-Independent Adhesion Pathway In Vitro", pages 805-811, see entire document.	1-29
Y	Proc. Natl. Acad. Sci., Volume 86, issued December 1989, C. Queen et al., "A Humanized Antibody That Binds To The Interleukin 2 Receptor", pages 10029-10033, see entire document.	1-29
Y	EP, A, 0,440,351 (Law et al.) 07 August 1991, see entire document.	1-29

フロントページの続き

(51)Int.Cl. [°]	識別記号	片内整理番号	F I
A 6 1 K 39/395	A C D A D Z		
C 0 7 K 16/26		8318-4H	
C 1 2 P 21/08		9358-4B	

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, H U, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, VN

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁵ : A61K 39/395, C07K 15/28, C12N 15/13, C12P 21/08	A1	(11) International Publication Number: WO 94/12215 (43) International Publication Date: 9 June 1994 (09.06.94)
(21) International Application Number: PCT/US93/11612 (22) International Filing Date: 30 November 1993 (30.11.93) (30) Priority Data: 07/983,946 1 December 1992 (01.12.92) US (60) Parent Application or Grant (63) Related by Continuation US 07/983,946 (CIP) Filed on 1 December 1992 (01.12.92) (71) Applicant (for all designated States except US): PROTEIN DESIGN LABS, INC. [US/US]; 2375 Garcia Avenue, Mountain View, CA 94043 (US). (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): CO, Man, Sung [GB/US]; 10230 Yoshino Place, Cupertino, CA 95014 (US). (74) Agents: LIEBESCHUETZ, Joseph et al.; Townsend and Townsend Khourie and Crew, One Market Plaza, 20th floor, Stuart Street Tower, San Francisco, CA 94105 (US).	(81) Designated States: AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, LV, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, US, VN, European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Published <i>With international search report.</i>	
(54) Title: HUMANIZED ANTIBODIES REACTIVE WITH L-SELECTIN		
(57) Abstract <p>Humanized immunoglobulins specifically reactive with L-selectin are prepared employing recombinant DNA technology for use in e.g., treatment of inflammatory disorders.</p>		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	GB	United Kingdom	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GN	Guinea	NE	Niger
BE	Belgium	GR	Greece	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	HU	Hungary	NO	Norway
BG	Bulgaria	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BJ	Benin	IT	Italy	PL	Poland
BR	Brazil	JP	Japan	PT	Portugal
BY	Belarus	KE	Kenya	RO	Romania
CA	Canada	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KZ	Kazakhstan	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxembourg	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	LV	Latvia	TG	Togo
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DE	Germany	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
DK	Denmark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	US	United States of America
FI	Finland	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

HUMANIZED ANTIBODIES REACTIVE WITH L-SELECTIN5 Cross-Reference to Related Inventions

This application is a continuation-in-part of USSN 07/983,946, filed 12/1/92, which is hereby incorporated by reference in its entirety for all purposes.

10 Field of the Invention

The present invention relates generally to the combination of recombinant DNA and monoclonal antibody technologies for developing novel biologics and, more particularly, for example, to the production of non-immunogenic (in humans) immunoglobulins specific for the L-selectin protein and their uses *in vitro* and *in vivo*.

Background of the Invention

The ability of cells to adhere to one another plays a critical role in development, normal physiology, and disease processes. This ability is mediated by adhesion molecules, generally glycoproteins, expressed on cell membranes. Often, an adhesion molecule on one cell type will bind to another adhesion molecule expressed on a different cell type, forming a receptor counter-receptor pair. Three very important classes of adhesion molecules are the integrins, selectins, and immunoglobulin (Ig) superfamily members (see Springer, *Nature* 346:425 (1990); Osborn, *Cell* 62:3 (1990); Hynes, *Cell* 69:11 (1992), all of which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes). These molecules are especially vital to the interaction of leukocytes and platelets with themselves and with the extracellular matrix and vascular endothelium.

Integrins are heterodimeric transmembrane glycoproteins consisting of an α chain (120-180 kD) and a β chain (90-110 kD), generally having short cytoplasmic domains. The α subunits all share sequence homology and motifs with each other, as do the β subunits. The three

known integrins containing the β subunit designated β_2 are important to the function of T cells, neutrophils and monocytes. LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) is widely distributed on lymphocytes, granulocytes and monocytes. Its counter-receptor is ICAM-1 (and perhaps of lesser importance, ICAM-2) an Ig family molecule which is expressed on many cells including leukocytes and is up-regulated on vascular endothelium by cytokines such as TNF and IL-1. Blocking LFA-1 on T cells with antibodies to either the α or β subunit strongly inhibits adhesion-dependent functions such as CTL-mediated lysis of target cells. Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) is distributed on neutrophils and monocytes, and its counter-receptor is also ICAM-1 (and possibly ICAM-2). Among other things, Mac-1 is the type 3 complement receptor (CR3) and binds the C3bi fragment. The third β_2 integrin, P150,95 ($\alpha_X\beta_2$), is also found on neutrophils and monocytes, but seems of less importance. The α subunits of LFA-1, Mac-1 and P150,95 are also given the respective CD designations CD11a, CD11b and CD11c, while β_2 is also denoted CD18, so that LFA-1 is CD11a/CD18 and Mac-1 is CD11b/CD18.

There are three known selectins, which were previously known as LECCAMs, and are now designated L-selectin (also called LECAM-1, Mel-14 or LAM-1), E-selectin (also called ELAM-1) and P-selectin (also called GMP140 or PADGEM). They have all been sequenced at the cDNA level and share sequence homology and motifs, including a lectin-like domain. L-selectin has a dual role: it is a homing receptor on T cells for the high endothelial venules of peripheral lymph nodes, and it is an adhesion molecule on neutrophils for endothelium (Hallmann et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174:236 (1991); which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes). E-selectin and P-selectin are both induced on endothelium by cytokines, although with different kinetics. L-selectin is a counter-receptor on neutrophils for both E-selectin and P-selectin (Picker et al., *Cell* 66:921 (1991), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes), although all three selectins probably have other counter-

receptors as well. In particular, E-selectin binds the carbohydrate group sialyl Lewis x (sLex) (Lowe et al., *Cell* 63:475 (1990)), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes), and while this carbohydrate is prominently presented on L-selectin (Picker et al., *Cell* 66:921 (1991)), it may occur on other proteins as well. E-selectin is expressed especially in cutaneous sites of inflammation and also serves as an adhesion molecule for skin-homing T cells that may contribute to the inflammation (Picker et al., *Nature* 349:796 (1991), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes).

In various assays, antibodies to CD11a, CD11b, CD18, L-selectin and E-selectin all block binding of neutrophils to activated endothelial cells to a lesser or greater degree, but the most complete inhibition is generally achieved by the combination of an antibody to CD18 and an antibody to L- or E-selectin (see, e.g., Lusciuskas, *J. Immunol.* 142:2257 (1989)), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes). A recent but now widely accepted model accounts for these facts with a three step process of adhesion (Butcher, *Cell* 67:1033 (1991), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes). In the first step, neutrophils reversibly bind to inflamed vascular endothelium via the selectins, which bind well under conditions of flow, causing the neutrophils literally to roll along the vascular wall. The neutrophils are then activated by a variety of stimulants surrounding or released by the endothelium, including IL-8, PAF and C5a. The activated neutrophils shed L-selectin and up-regulate Mac-1. In the final step, binding of Mac-1 to ICAM-1 and perhaps other counter-receptors on the endothelial cells allows stable adhesion and extravasation through the endothelium.

In principle, antibodies or other antagonists of the integrin and selectin adhesion molecules could abort this process, by preventing neutrophils from binding to endothelium and from extravasating into tissues. Hence such antibodies could be used to treat a great many different

disease conditions of which inflammation is an important component.

For example, in animal models anti-CD18 antibodies, which bind to both LFA-1 and Mac-1, have been useful in
5 reducing ischemia-reperfusion injury (see, e.g., Vedder et al., *J. Clin. Invest.* 81:939 (1988); Vedder et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2643 (1990); U.S. Patent No. 4,797,277). They also reduce neutrophil-mediated damage in the lung in response to various insults (Doerschuk et al., *J.*
10 *Immunol.* 144:2327 (1990) and Mulligan et al., *J. Immunol.* 148:1847 (1992)), including gram-negative sepsis (Walsh et al., *Surgery* 110:205 (1991)). In a rabbit model, anti-CD18 antibodies also protect from lethality due to meningitis (Tuomanen et al., *J. Exp. Med.* 170:959 (1990)). They may
15 also be useful in preventing or treating organ transplant rejection because they block T-cell function.

For example, injection of antibodies to L-selectin or E-selectin into rodents suppressed neutrophil accumulation within inflamed peritoneum (Jutila et al., *J. Immunol.*
20 143:3318 (1989) and Mulligan et al., *J. Clin. Invest.* 88:1396 (1991)). Intravital video microscopy revealed that an anti-L-selectin antibody strongly inhibits rolling of leukocytes along the vascular wall endothelium of mesenteric venules exteriorized from rabbits (von Andrian et al., *Proc. Natl.*
25 *Acad. Sci. USA* 88:7538 (1991)). An anti-E-selectin antibody greatly reduced vascular injury induced by immune complex deposition in the skin or lungs of rats, and substantially reduced neutrophil accumulation at those sites (Mulligen et al., *J. Clin. Invest.* 88:1396 (1991)). Also, in a primate
30 model of extrinsic asthma, an anti-E-selectin antibody greatly reduced neutrophil influx into the lung and associated late-phase airway obstruction after antigen inhalation (Gundel et al., *J. Clin. Invest.* 88:1407 (1991)).

Several antibodies including mouse DREG-55, mouse
35 DREG-56 and mouse DREG-200 have been developed that bind to human L-selectin (Kishimoto et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2244 (1990), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes). These antibodies

partially or completely block the binding of human lymphocytes to peripheral lymph node high endothelial venules, and the binding of human neutrophils to stimulated human umbilical vein endothelial cells (Kishimoto et al., *Blood* 78:805 (1991), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes). The capacity of these antibodies to block binding of neutrophils to endothelial cells indicates that the antigen to which they bind, L-selectin, may be an appropriate target for potential therapeutic agents.

Unfortunately, the use of non-human monoclonal antibodies such as mouse DREG-200 have certain drawbacks in human treatment, particularly in repeated therapeutic regimens as explained below. Mouse monoclonal antibodies, for example, have a relatively short circulating half-life, and lack other important immunoglobulin functional characteristics when used in humans.

Perhaps more importantly, non-human monoclonal antibodies contain substantial stretches of amino acid sequences that will be immunogenic when injected into a human patient. Numerous studies have shown that, after injection of a foreign antibody, the immune response elicited by a patient against an antibody can be quite strong, essentially eliminating the antibody's therapeutic utility after an initial treatment. Moreover, as increasing numbers of different mouse or other antigenic (to humans) monoclonal antibodies can be expected to be developed to treat various diseases, after the first or several treatments with any different non-human antibodies, subsequent treatments even for unrelated therapies can be ineffective or even dangerous in themselves, because of cross-reactivity. While the production of so-called "chimeric antibodies" (e.g., mouse variable regions joined to human constant regions) has proven somewhat successful, a significant immunogenicity problem remains.

To attempt to overcome immunogenicity problems several examples of humanized antibodies have been produced. The transition from a murine to a humanized antibody involves

a compromise of competing considerations, the solution to which varies for different antibodies. To minimize immunogenicity, the immunoglobulin should retain as much of the human acceptor sequence as possible. However, to retain authentic binding properties, the immunoglobulin framework should contain sufficient substitutions of the human acceptor sequence to ensure a three-dimensional conformation of CDR regions as close as possible to that in the mouse donor immunoglobulin. As a result of these competing considerations, many humanized antibodies produced to-date show significant loss of binding affinity compared with corresponding murine antibodies. See, e.g., Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Shearman et al., *J. Immunol.* 147:4366-4373 (1991); Kettleborough *Protein Engineering* 4:773-783 (1991); Gorman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4181-4185 (1991); Tempest et al., *Biotechnology* 9:266-271 (1991); Riechmann et al., *Nature* 332:323 (1988) and EPO Publication No. 0239400 (each of which is hereby by reference in its entirety for all purposes).

Thus, there is a need for improved forms of humanized immunoglobulins specific for L-selectin antigen that are substantially non-immunogenic in humans, yet easily and economically produced in a manner suitable for therapeutic formulation and other uses. The present invention fulfills these and other needs.

Summary of the Invention

The present invention provides novel compositions useful, for example, in the treatment of inflammatory human disorders, the compositions containing humanized immunoglobulins specifically capable of binding to L-selectin. The immunoglobulins can have two pairs of light chain/heavy chain complexes, at least one chain comprising one or more mouse complementarity determining regions functionally joined to human framework region segments. For example, mouse complementarity determining regions, with or without additional naturally-associated mouse amino acid residues, can be introduced into human framework regions to

produce humanized immunoglobulins capable of binding to the L-selectin at affinity levels stronger than about 10^7 M^{-1} . These humanized immunoglobulins will also be capable of blocking the binding of the CDR-donating mouse monoclonal antibody to L-selectin.

The immunoglobulins, including binding fragments and other derivatives thereof, of the present invention may be produced readily by a variety of recombinant DNA techniques, with ultimate expression in transfected cells, preferably immortalized eukaryotic cells, such as myeloma or hybridoma cells. Polynucleotides comprising a first sequence coding for humanized immunoglobulin framework regions and a second sequence set coding for the desired immunoglobulin complementarity determining regions can be produced synthetically or by combining appropriate cDNA and genomic DNA segments.

The humanized immunoglobulins may be utilized alone in substantially pure form, or together with a chemotherapeutic agent such as a non-steroidal anti-inflammatory drug (e.g., aspirin), a corticosteroid, or an immunosuppressant. All of these compounds will be particularly useful in treating inflammatory disorders. The humanized immunoglobulins or their complexes can be prepared in a pharmaceutically acceptable dosage form, which will vary depending on the mode of administration.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1. Sequences of the CDNA and translated amino acid sequences of the light chain (A) and heavy chain (B) variable regions of the mouse DREG-200 antibody. The mature heavy chain begins with amino acid 20 E, and the mature light chain begins with amino acid 21 D, preceded by the respective signal sequences.

Figure 2. Amino acid sequences of the mature light chain (A) and heavy chain (B) variable regions of the mouse DREG-200 antibody (upper lines) and humanized DREG-200 antibody (lower lines). The three CDRs in each chain are underlined. Residues in the framework that have been

replaced with mouse amino acids or typical human amino acids in the humanized antibody are double underlined.

Figure 3. Nucleotide sequences of the genes encoding the light chain (A) and heavy chain (B) variable regions of the humanized DREG-200 antibody, beginning and ending with the XbaI sites, and translated amino acid sequences, including signal sequences.

Figure 4. Competitive binding of mouse and humanized IgG1 and IgG4 DREG-200 antibodies. The target cells were L2-1 cells, a mouse pre-B cell line, that was transfected with a human L-selectin gene and thus expresses human L-selectin (Berg et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 184:1048 (1992)). 5×10^5 cells were incubated with 3 ng of ^{125}I -labeled tracer mouse antibody ($2 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$), together with increasing amounts of mouse or humanized competitor antibody as indicated in 0.2 ml of binding buffer (PBS + 2% FBS + 0.1% azide) for 1 hr at 4°C. Cells were washed and pelleted, and their bound radioactivity measured. The concentrations of bound and free tracer antibody were calculated.

Figure 5. Binding of human neutrophils to IL-1 stimulated human umbilical cord endothelial cells (HUVEC). The neutrophils were first treated with irrelevant control antibody, mouse DREG-200 antibody, or humanized IgG1 DREG-200 antibody, or left untreated, as indicated.

Figure 6. Protection of ischemic-reperfused heart tissue by humanized DREG-200. The Figure shows for cats treated with humanized DREG-200 or control antibody, from left to right: area at risk/total ventricular area; necrotic tissue area/area at risk; and necrotic tissue area/total left ventricle area. Brackets represent \pm SEM for six cats; heights of bars are means.

DEFINITIONS

The term "substantial identity" or "substantial homology" means that two peptide sequences, when optimally aligned, such as by the programs GAP or BESTFIT using default gap weights, share at least 65 percent sequence identity, preferably at least 80 or 90 percent sequence identity, more

preferably at least 95 percent sequence identity or more (e.g., 99 percent sequence identity). Preferably, residue positions which are not identical differ by conservative amino acid substitutions.

5 For purposes of classifying amino acids substitutions as conservative or nonconservative, amino acids are grouped as follows: Group I (hydrophobic sidechains): norleucine, met, ala, val, leu, ile; Group II (neutral hydrophilic side chains): cys, ser, thr; Group III (acidic
10 side chains): asp, glu; Group IV (basic side chains): asn, gln, his, lys, arg; Group V (residues influencing chain orientation): gly, pro; and Group VI (aromatic side chains): trp, tyr, phe. Conservative substitutions involve substitutions between amino acids in the same class. Non-
15 conservative substitutions constitute exchanging a member of one of these classes for a member of another.

 Amino acids from the variable regions of the mature heavy and light chains of immunoglobulins are designated Hx and Lx respectively, where x is a number designating the
20 position of an amino acids according to the scheme of Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991). Kabat lists many amino acid sequences for antibodies for each subclass, and lists the most commonly occurring amino acid
25 for each residue position in that subclass. Kabat uses a method for assigning a residue number to each amino acid in a listed sequence, and this method for assigning residue numbers has become standard in the field. Kabat's scheme is extendible to other antibodies not included in his compendium
30 by aligning the antibody in question with one of the consensus sequences in Kabat. The use of the Kabat numbering system readily identifies amino acids at equivalent positions in different antibodies. For example, an amino acid at the L50 position of a human antibody occupies the equivalent
35 position to an amino acid position L50 of a mouse antibody.

 From N-terminal to C-terminal, both light and heavy chains comprise the domains FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 and FR4. The assignment of amino acids to each domain is in

5 DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Humanized Antibodies Against L-Selectin

25 In accordance with the present invention, humanized immunoglobulins specifically reactive with L-selectin related epitopes are provided. These immunoglobulins usually have binding affinities to L-selectin of at least about 10^7 M^{-1} , and preferably 10^8 M^{-1} to 10^9 M^{-1} , 10^{10} M^{-1} or stronger and, 30 are capable of, e.g., binding to neutrophils. The humanized immunoglobulins will have a human framework and will have one or more complementarity determining regions (CDRs) from an immunoglobulin, typically a mouse immunoglobulin, specifically reactive with L-selectin. In a preferred 35 embodiment, one or more of the CDRs will come from the mouse DREG-200 antibody, and the humanized immunoglobulin will be of the IgG1 or IgG4 isotype. Thus, the immunoglobulins of the present invention, which can be produced economically in

large quantities, find use, for example, in the treatment of inflammatory disorders in human patients by a variety of techniques.

5 The basic antibody structural unit is known to comprise a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kD) and one "heavy" chain (about 50-70 kD). The NH₂-terminus of each chain begins a variable region of about 100 to 110 or more amino acids primarily responsible
10 for antigen recognition. The COOH part of each chain defines a constant region primarily responsible for effector function.

Light chains are classified as either kappa or lambda. Heavy chains are classified as gamma, mu, alpha,
15 delta, or epsilon, and define the antibody's isotype as IgG, IgM, IgA, IgD and IgE, respectively. Within light and heavy chains, the variable and constant regions are joined by a "J" region of about 12 or more amino acids, with the heavy chain also including a "D" region of about 10 more amino acids.
20 (See, generally, *Fundamental Immunology*, Paul, W., Ed., Chapter 7, pp. 131-166, Raven Press, N.Y. (1984), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes.)

The variable regions of each light/heavy chain pair
25 form the antibody binding site. The chains all exhibit the same general structure of relatively conserved framework regions joined by three hypervariable regions, also called Complementarity Determining Regions or CDRs (see "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al.,
30 U.S. Department of Health and Human Services (1987); and Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987), which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes). The CDRs from the two chains of each pair are aligned by the framework regions, enabling binding to a
35 specific epitope.

As used herein, the term "immunoglobulin" refers to a protein consisting of one or more polypeptides substantially encoded by immunoglobulin genes. The

recognized immunoglobulin genes include the kappa, lambda, alpha, gamma, delta, epsilon and mu constant region genes, as well as the myriad immunoglobulin variable region genes. The immunoglobulins may exist in a variety of forms besides antibodies; including, for example, Fv, Fab, and (Fab')₂ as well as bifunctional antibodies (e.g., Lanzavecchia et al., *Eur. J. Immunol.* 17:105 (1987)) and in single chains (e.g., Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883 (1988) and Bird et al., *Science*, 242:423-426 (1988), which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes). (See, generally, Hood et al., *Immunology* (Benjamin, N.Y., 2nd ed., 1984), Harlow & Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) and Hunkapiller & Hood, *Nature*, 323:15-16 (1986), each of which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes).

Chimeric antibodies are antibodies whose light and heavy chain genes have been constructed, typically by genetic engineering, from immunoglobulin gene segments belonging to different species. For example, the variable (V) segments of the genes from a mouse monoclonal antibody may be joined to human constant (C) segments, such as γ_1 and γ_4 . A typical therapeutic chimeric antibody is thus a hybrid protein consisting of the V or antigen-binding domain from a mouse antibody and the C or effector domain from a human antibody, although other mammalian species may be used.

As used herein, the term "framework region" refers to those portions of immunoglobulin light and heavy chain variable regions that are relatively conserved (i.e., other than the CDRs) among different immunoglobulins in a single species, as defined by Kabat, et al., *supra*. As used herein, a "human framework region" is a framework region that is substantially identical (about 85% or more) to the framework region of a naturally occurring human antibody or a consensus sequence of several such antibodies.

As used herein, the term "humanized immunoglobulin" refers to an immunoglobulin comprising a human framework, at least one CDR from a non-human antibody, and in which any

constant region present is substantially identical to a human immunoglobulin constant region, i.e., at least about 85-90%, preferably at least 95% identical. Hence, all parts of a humanized immunoglobulin, except possibly the CDRs, are substantially identical to corresponding parts of one or more native human immunoglobulin sequences. For example, a humanized immunoglobulin would not encompass a chimeric mouse variable region/human constant region antibody.

Humanized antibodies have at least three potential advantages over mouse, and in some cases chimeric antibodies, for use in human therapy:

- 1) because the effector portion is human, it may interact better with the other parts of the human immune system (e.g., destroy the target cells more efficiently by complement-dependent cytotoxicity (CDC) or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)).
- 2) The human immune system should not recognize the framework or C region of the humanized antibody as foreign, and therefore the antibody response against such an injected antibody should be less than against a totally foreign mouse antibody or a partially foreign chimeric antibody.
- 3) Injected mouse antibodies have been reported to have a half-life in the human circulation much shorter than the half-life of normal antibodies (Shaw, D. et al., *J. Immunol.* 138:4534-4538 (1987)). Injected humanized antibodies will presumably have a half-life more like that of naturally occurring human antibodies, allowing smaller and less frequent doses to be given.

In one aspect, the present invention is directed to recombinant DNA segments encoding the heavy and/or light chain CDRs from an immunoglobulin capable of binding to a desired epitope of L-selectin, such as monoclonal antibodies mouse DREG-200, mouse DREG-55 or mouse DREG-56 (Kishimoto et

al. (1990), *supra*, which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes). The DNA segments encoding these regions will typically be joined to DNA segments encoding appropriate human framework regions. Exemplary DNA sequences, which on expression code for the polypeptide chains comprising the heavy and light chain CDRs of monoclonal antibody mouse DREG-200 are included in Fig. 1. Due to codon degeneracy and non-critical amino-acid substitutions, other DNA sequences can be readily substituted for those sequences, as detailed below. For a detailed description of the design and production of humanized immunoglobulins, see commonly assigned serial nos. 07/290,975 and 07/310,252, filed December 28, 1988 and February 13, 1989, respectively, both of which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes.

The DNA segments will typically further include an expression control DNA sequence operably linked to the humanized immunoglobulin coding sequences, including naturally-associated or heterologous promoter regions. Preferably, the expression control sequences will be eukaryotic promoter systems in vectors capable of transforming or transfecting eukaryotic host cells, but control sequences for prokaryotic hosts may also be used. Once the vector has been incorporated into the appropriate host, the host is maintained under conditions suitable for high level expression of the nucleotide sequences, and, as desired, the collection and purification of the light chains, heavy chains, light/heavy chain dimers or intact antibodies, binding fragments or other immunoglobulin forms may follow.

The nucleic acid sequences of the present invention capable of ultimately expressing the desired humanized antibodies can be formed from a variety of different polynucleotides (genomic or cDNA, RNA, synthetic oligonucleotides, etc.) and components (e.g., V, J, D, and C regions), as well as by a variety of different techniques. Joining appropriate genomic and synthetic sequences is presently the most common method of production, but cDNA sequences may also be utilized (see European Patent

Publication No. 0239400 and Riechmann, L. et al., *Nature* 332:323-327 (1988), both of which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes).

Human constant region DNA sequences can be isolated
5 in accordance with well known procedures from a variety of
human cells, but preferably immortalized B-cells (see Kabat,
supra, and WP87/02671). The CDRs for producing the
immunoglobulins of the present invention will be similarly
10 derived from monoclonal antibodies capable of binding to L-
selectin and produced in any convenient mammalian source,
including, mice, rats, rabbits, or other vertebrate capable
of producing antibodies by well known methods. Suitable
source cells for the DNA sequences and host cells for
15 immunoglobulin expression and secretion can be obtained from
a number of sources, such as the American Type Culture
Collection (*Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*, Fifth
edition (1985) Rockville, MD, which is incorporated herein by
reference in its entirety for all purposes). In preferred
embodiments, the CDRs have sequences corresponding to the CDR
20 sequences of mouse DREG-200, mouse DREG-55, or mouse DREG-56,
respectively, and may include degenerate nucleotide sequences
encoding the corresponding CDR amino acid sequence(s) of
mouse DREG-200, mouse DREG-55, or mouse DREG-56.

In addition to the humanized immunoglobulins
25 specifically described herein, other "substantially
homologous" modified immunoglobulins can be readily designed
and manufactured utilizing various recombinant DNA techniques
well known to those skilled in the art. Other human
antibodies than the Eu antibody discussed in Example 2 can be
30 used as a source of framework sequence. These framework
sequences should exhibit a high degree of sequence identity
with the mouse DREG-200 variable framework domains from which
the CDRs were derived. The heavy and light chain variable
framework regions can be derived from the same or different
35 human antibody sequences. Indeed, the heavy and light chain
framework regions can each be derived from more than one
human antibody. The human antibody sequences can be the
sequences of naturally occurring human antibodies or can be

consensus sequences of several human antibodies. See Carter et al., WO 92/22653 (1992).

5 The unnatural juxtaposition of murine CDR regions with human variable framework region can result in unnatural conformational restraints, which, unless corrected by substitution of certain amino acid residues, lead to loss of binding affinity. The selection of amino acid residues for substitution is determined, in part, by computer modelling. Computer hardware and software for producing three-
10 dimensional images of immunoglobulin molecules are widely available. In general, molecular models are produced starting from solved structures for immunoglobulin chains or domains thereof. The chains to be modelled are compared for amino acid sequence similarity with chains or domains of
15 solved three dimensional structures, and the chains or domains showing the greatest sequence similarity is/are selected as starting points for construction of the molecular model. The solved starting structures are modified to allow for difference between the actual amino acids in the
20 immunoglobulin chains or domains being modelled, and those in the starting structure. The modified structures are then assembled into a composite immunoglobulin. Finally, the model is refined by energy minimization and by verifying that all atoms are within appropriate distances from one another
25 and that bond lengths and angles are within chemically acceptable limits. Example 2 discusses in more detail the steps taken to produce a three dimensional computer model for the variable regions of the mouse DREG-200 antibody. This model can in turn serve as a starting point for predicting
30 the three-dimensional structure of an antibody containing the mouse DREG-200 complementarity determining regions substituted in human framework structures. Additional models can be constructed representing the structure when further amino acid substitutions, to be discussed *infra*, are
35 introduced.

In general, substitution of human amino acid residues with murine should be minimized, because introduction of murine residues increases the risk of the

antibody eliciting a HAMA response in humans. Amino acids are selected for substitution based on their possible influence on CDR conformation and/or binding to antigen. Investigation of such possible influences is by modelling, examination of the characteristics of the amino acids at particular locations, or empirical observation of the effects of substitution or mutagenesis of particular amino acids.

When an amino acid differs between a mouse DREG-200 variable framework region and an equivalent human variable framework region, the human framework amino acid should usually be substituted by the equivalent mouse amino acid if it is reasonably expected that the amino acid:

- (1) noncovalently contacts antigen directly, or
- (2) is adjacent to a CDR region or otherwise interacts with a CDR region (e.g., is within about 4-6 Å of a CDR region).

Other candidates for substitution are acceptor human framework amino acids that are unusual for a human immunoglobulin at that position (e.g., amino acid H113 of human Eu antibody). These amino acids can be substituted with amino acids from the equivalent position of more typical human immunoglobulins. Alternatively, amino acids from equivalent positions in the mouse DREG-200 can be introduced into the human framework regions when such amino acids are typical of human immunoglobulin at the equivalent positions.

In general, substitution of all or most of the amino acids fulfilling the above criteria is desirable. Occasionally, however, there is some ambiguity about whether a particular amino acid meets the above criteria, and alternative variant immunoglobulins are produced, one of which has that particular substitution, the other of which does not. The humanized antibodies of the present invention will usually contain a substitution with a mouse light chain framework residue with a corresponding mouse DREG-200 residue in at least 1, 2, 3, 4 and more usually 5, of the following positions: L87, L54, L66, L76 and L93. The humanized antibodies also usually contain a substitution with a mouse heavy chain framework residue in at least 1, 3, 5, 7, 9, 10,

11 and, more usually 12 of the following positions: H93, H95, H98, H111, H112, H115, H30, H98, H111, H27, H48, and H72. In preferred embodiments when the human heavy chain acceptor immunoglobulin is Eu, the heavy chain also contains a substitution at H113. This position is usually substituted with the amino acid from the equivalent position of a human immunoglobulin having a more typical amino acid residues.

Usually the CDR regions in humanized antibodies are substantially identical, and more usually, identical to the corresponding CDR regions in the mouse DREG-200 antibody. Occasionally, however, it is desirable to change one of the residues in a CDR region, for example, to create a resemblance to the binding site of a ligand of L-selectin. Although not usually desirable, it is sometimes possible to make one or more conservative amino acid substitutions of CDR residues without appreciably affecting the binding affinity of the resulting humanized immunoglobulin.

Other than for the specific amino acid substitutions discussed above, the framework regions of humanized immunoglobulins are usually substantially identical, and more usually, identical to the framework regions of the human antibodies from which they were derived. However, in some embodiments the framework regions can vary from the native sequences at the primary structure level by several amino acid substitutions, terminal and intermediate additions and deletions, and the like. Stereoisomers (e.g., D-amino acids) of the twenty conventional amino acids, unnatural amino acids such as α,α -disubstituted amino acids, N-alkyl amino acids, lactic acid, and other unconventional amino acids may also be suitable components for polypeptides of the present invention. Of course, many of the amino acids in the framework region make little or no direct contribution to the specificity or affinity of an antibody. Thus, many individual conservative substitutions of framework residues can be tolerated without appreciable change of the specificity or affinity of the resulting humanized immunoglobulin. However, in general, such substitutions are undesirable. Modifications of the genes may be readily

accomplished by a variety of well-known techniques, such as site-directed mutagenesis (see Gillman & Smith, *Gene* 8:81-97 (1979) and Roberts et al., *Nature* 328:731-734 (1987), both of which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes).

Alternatively, polypeptide fragments comprising only a portion of the primary antibody structure may be produced, which fragments possess one or more immunoglobulin activities (e.g., binding activity). These polypeptide fragments may be produced by proteolytic cleavage of intact antibodies by methods well known in the art, or by inserting stop codons at the desired locations in the vectors pV_k and pV_g1-dhfr using site-directed mutagenesis, such as after CH1 to produce Fab fragments or after the hinge region to produce (Fab')₂ fragments. Single chain antibodies may be produced by joining VL and VH with a DNA linker (see Huston et al., *supra*, and Bird et al., *supra*). As one example, Fv or Fab fragments may be produced in *E. coli* according to the methods of Buchner and Rudolph, *Bio/Technology* 9:157-162 (1991) and Skerra et al., *Bio/Technology* 9:273-277 (1991), incorporated herein by reference in their entirety for all purposes. Fv and Fab may also be produced by expression of encoding polynucleotides in eukaryotic, preferably mammalian, cells. Also because like many genes, the immunoglobulin-related genes contain separate functional regions, each having one or more distinct biological activities, the genes may be fused to functional regions from other genes (e.g., enzymes, see commonly assigned U.S.S.N. 132,387, filed Dec. 15, 1987, which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes) to produce fusion proteins (e.g., immunotoxins) having novel properties.

Expression of the humanized immunoglobulin sequences in bacterial hosts may be used to advantage to select higher affinity humanized immunoglobulin sequences by mutagenizing the CDR regions and producing bacteriophage display libraries which may be screened for humanized immunoglobulin CDR variants which possess high affinity and/or high specificity binding to L-selectin. One potential

advantage of such affinity sharpening is the generation of humanized immunoglobulin CDR variants which have improved binding affinity and/or reduced cross-reactivity with molecules other than L-selectins. Methods for producing phage display libraries having immunoglobulin variable region sequences are provided in the art, for example, see Cesareni, *FEBS Lett* 307:66-70 (1992); Swimmer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3756-60 (1992); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-80 (1992); Clackson et al., *Nature* 352:624-8 (1991); Scott & Smith, *Science* 249:386-90 (1990); Garrard et al., *Bio/Techniques* 9:1373-1377 (1991), which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes. The resultant affinity sharpened CDR variant humanized immunoglobulin sequences are subsequently expressed in a suitable host for efficient expression.

As stated previously, the DNA sequences will be expressed in hosts after the sequences have been operably linked to (i.e., positioned to ensure the functioning of) an expression control sequence. These expression vectors are typically replicable in the host organisms either as episomes or as an integral part of the host chromosomal DNA. Commonly, expression vectors will contain selection markers, e.g., tetracycline-resistance (tet^R), G418-resistance (neo^R), mycophenolic acid-resistance (gpt), or HSV-tk, to permit detection of those cells transformed with the desired DNA sequences (see, e.g., U.S. Patent 4,704,362, which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes).

E. coli is one prokaryotic host useful particularly for cloning the DNA sequences of the present invention. Other microbial hosts suitable for use include bacilli, such as *Bacillus subtilis*, and other enterobacteriaceae, such as *Salmonella*, *Serratia*, and various *Pseudomonas* species. In these prokaryotic hosts, one can also make expression vectors, which will typically contain expression control sequences compatible with the host cell (e.g., an origin of replication). In addition, any number of a variety of well-known promoters will be present, such as the lactose promoter

system, a tryptophan (trp) promoter system, a beta-lactamase promoter system, or a promoter system from phage lambda. The promoters will typically control expression, optionally with an operator sequence, and have ribosome binding site sequences and the like, for initiating and completing transcription and translation.

Other microbes, such as yeast, may also be used for expression. *Saccharomyces* is a preferred host, with suitable vectors having expression control sequences, such as promoters, including 3-phosphoglycerate kinase or other glycolytic enzymes, and an origin of replication, termination sequences and the like as desired.

Plants and plant cell cultures may be used for expression of the humanized immunoglobulins of the invention. (Larrick & Fry, *Hum. Antibodies Hybridomas* 2(4):172-89 (1991); Benvenuto et al., *Plant Mol. Biol.* 17(4):865-74 (1991); Durin et al., *Plant Mol. Biol.* 15(2):281-93 (1990); Hiatt et al., *Nature* 342:76-8 (1989), incorporated herein by reference in their entirety for all purposes). Preferable plant hosts include, for example: *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*, and *Solanum tuberosum*. A preferred expression cassette for expressing polynucleotide sequences encoding the humanized anti-L-selectin antibodies of the invention is the plasmid pMOG18 in which the inserted polynucleotide sequence encoding the humanized immunoglobulin chain is operably linked to a CaMV 35S promoter with a duplicated enhancer; pMOG18 is used according to the method of Sijmons et al., *Bio/Technology* 8:217-221 (1990), incorporated herein by reference in its entirety for all purposes. Alternatively, a preferred embodiment for the expression of humanized immunoglobulins in plants follows the methods of Hiatt et al., *supra*, with the substitution of polynucleotide sequences encoding the humanized anti-L-selectin antibodies of the invention for the immunoglobulin sequences used by Hiatt et al., *supra*. *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA-based vectors may also be used for expressing humanized immunoglobulin sequences, preferably

such vectors include a marker gene encoding spectinomycin-resistance or other selectable marker.

5 Insect cell culture may also be used to produce the humanized immunoglobulins of the invention, typically using a baculovirus-based expression system. The humanized immunoglobulins may be produced by expressing polynucleotide sequences encoding the humanized immunoglobulins according to the methods of Putlitz et al., *Bio/Technology* 8:651-654 (1990), incorporated herein by reference in its entirety for all purposes. The method of Putlitz et al. can be followed with the modification that polynucleotide sequences encoding the humanized anti-L-selectin antibodies of the invention are inserted in place of the mouse monoclonal Ab 6A4 heavy chain and light chain cDNA sequences of Putlitz et al.

15 In addition to microorganisms and plants, mammalian tissue cell culture may also be used to express and produce the polypeptides of the present invention (see Winnacker, *From Genes to Clones* (VCH Publishers, NY, 1987), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes). Mammalian cells are actually preferred, because a number of suitable host cell lines capable of secreting intact immunoglobulins have been developed in the art, and include the CHO cell lines, various COS cell lines, HeLa cells, preferably myeloma cell lines, etc, or transformed B-cells or hybridomas. Expression vectors for these cells can include expression control sequences, such as an origin of replication, a promoter, an enhancer (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49-68 (1986), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes), and necessary processing information sites, such as ribosome binding sites, RNA splice sites, polyadenylation sites, and transcriptional terminator sequences. Preferred expression control sequences are promoters derived from immunoglobulin genes, SV40, Adenovirus, Bovine Papilloma Virus, cytomegalovirus and the like. Generally, a selectable marker, such as a neo^R expression cassette, is included in the expression vector.

35 Transgenes encoding a humanized immunoglobulin of the invention may be used to generate transgenic nonhuman

animals which express the desired humanized immunoglobulin, typically in a recoverable body fluid such as milk or serum. Such transgenes comprise a polynucleotide sequence encoding the humanized immunoglobulin(s) operably linked to a promoter, usually with a linked enhancer, such as a rodent immunoglobulin enhancer or a casein gene promoter/enhancer (Buhler et al., *Bio/Technology* 8:140-143 (1990); Meade et al., *Bio/Technology* 8:443-446 (1990), incorporated herein by reference in its entirety for all purposes). Transgenes may be transferred into cells and embryos according to the methods described in the art and, *infra*, for homologous recombination constructs. Preferred nonhuman animals include: mice, rats, sheep, cows, and goats; with expression in bovine milk being particularly preferred. See WO91/08216 (1991) (which is incorporated in its entirety for all purposes). Purification of the humanized antibodies is accomplished by art-known purification methods for immunoglobulin purification.

The vectors containing the DNA segments of interest (e.g., the heavy and light chain encoding sequences and expression control sequences) can be transferred into the host cell by well-known methods, which vary depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection is commonly utilized for prokaryotic cells, whereas calcium phosphate treatment, lipofection, biolistics, viral-based transduction, or electroporation may be used for other cellular hosts. Tungsten particle ballistic transgenesis is preferred for plant cells and tissues. (See, generally, Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press, 1982), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes.)

Once expressed, the whole antibodies, their dimers, individual light and heavy chains, or other immunoglobulin forms of the present invention can be purified according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, gel electrophoresis and the like (see, generally, Scopes, R.,

Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes). Substantially pure immunoglobulins of at least about 90 to 95% homogeneity are preferred, and 98 to 99% or more homogeneity most preferred, for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the polypeptides may then be used therapeutically (including extracorporeally) or in developing and performing assay procedures, immunofluorescent stainings, and the like. (See, generally, *Immunological Methods*, Vols. I and II (Lefkovits and Pernis, eds., Academic Press, NY, 1979 and 1981).

In a preferred embodiment, humanized immunoglobulins are produced which bind to L-selectin with a binding affinity of at least $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ in standard binding conditions (e.g., phosphate-buffered saline with 2 percent fetal bovine serum at 25°C); one example of such humanized immunoglobulins is the humanized DREG-200 antibody comprising the amino acid sequences shown in Figure 2. (Hereinafter, the humanized DREG-200 antibody is sometimes referred to as "hu DREG-200.") Humanized immunoglobulins comprising the CDRs from mouse DREG-55 or from mouse DREG-56 also can bind to L-selectin with an affinity of at least $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. The humanized antibodies of the invention preferably bind, in standard binding conditions, to human L-selectin with an affinity of at least $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, more preferably with an affinity of at least $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, and advantageously with an affinity of at least $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ or stronger. Usually, the binding affinity of a humanized immunoglobulin is within a factor of three of the mouse immunoglobulin from which it was derived. For, example the affinity of the mouse DREG-200 antibody is about 10^8 M^{-1} .

Computers

In another aspect of the invention, computers programmed to display three dimensional images of antibodies on a monitor are provided. For example, a Silicon Graphics IRIS 4D workstation running under the UNIX operating system and using the molecular modelling package QUANTA (Polygen

Corp. USA) is suitable. Computers are useful for generating variants of humanized antibodies. In general, the antibodies of the invention already provide satisfactory binding affinity. However, it is likely that antibodies with even stronger binding affinity could be identified by further variation of certain amino acid residues. The three dimensional image will also identify many noncritical amino acids, which could be the subject of conservative substitutions without appreciable affecting the binding affinity of the antibody. Collectively even conservative substitutions can have a significant effect on the properties of an immunoglobulin. However, it is likely many individual conservative substitutions will not significantly impair the properties of the immunoglobulins.

Human Antibodies Against L-Selectin

In another aspect of the invention, human antibodies against L-selectin are provided. These antibodies are produced by a variety of techniques described below. Some human antibodies are selected by competitive binding experiments, or otherwise, to have the same epitope specificity as a particular mouse antibody, such as mouse DREG-200 or a humanized version thereof. Such antibodies are particularly likely to share the useful therapeutic properties demonstrated for humanized DREG-200.

Antibodies having the required epitope specificity can also be identified by screening for the capacity to block neutrophil-endothelial cell interaction. A simple visual assay for detecting such interaction has been described by Kishimoto et al. (1991), *supra*. Briefly, monolayers of human umbilical vein cells are stimulated with IL-1. Neutrophils, with or without pretreatment with the antibody under test, are added to the monolayer under defined conditions, and the number of adhering neutrophils is determined microscopically. In one method, the neutrophils are obtained from human leukocyte adhesion deficient patients. See Anderson et al., *Ann. Rev. Med.* 38:175 (1987). The neutrophils from such patients lack integrin receptors, whose binding to

neutrophils might obscure the effects of blocking L-selectin binding.

a. Trioma Methodology

5 The basic approach and an exemplary cell fusion partner, SPAZ-4, for use in this approach have been described by Oestberg et al., *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, U.S. Patent No. 4,634,664; and Engleman et al., US Patent 4,634,666 (each of which is incorporated by reference in its entirety for all purposes). The antibody-producing cell
10 lines obtained by this method are called triomas, because they are descended from three cells--two human and one mouse. Initially, a mouse myeloma line is fused with a human B-lymphocyte to obtain a non-antibody-producing xenogeneic hybrid cell, such as the SPAZ-4 cell line described by
15 Oestberg, *supra*. The xenogeneic cell is then fused with an immunized human B-lymphocyte to obtain an antibody-producing trioma cell line. Triomas have been found to produce antibody more stably than ordinary hybridomas made from human cells.

20 The immunized B-lymphocytes are obtained from the blood, spleen, lymph nodes or bone marrow of a human donor. *In vivo* immunization of a living human with L-selectin is usually undesirable because of the risk of initiating a harmful response. Thus, B-lymphocytes are usually immunized
25 *in vitro* with an L-selectin polypeptide, an antigenic fragment thereof or a cell bearing either of these. If antibodies against a specific antigen or epitope are desired, it is preferable to use that antigen or epitope thereof for *in vitro* immunization. B-lymphocytes are typically exposed
30 to antigen for a period of 7-14 days in a media such as RPMI-1640 (see Engleman, *supra*) supplemented with 10% human plasma.

The immunized B-lymphocytes are fused to a xenogeneic hybrid cell such as SPAZ-4 by well known methods.
35 For example, the cells are treated with 40-50% polyethylene glycol of MW 1000-4000, at about 37 degrees, for about 5-10 min. Cells are separated from the fusion mixture and propagated in media selective for the desired hybrids (e.g.,

HAT or AH). Clones secreting antibodies having the required binding specificity are identified by assaying the trioma culture medium for the ability to bind to L-selectin or a fragment thereof. Triomas producing human antibodies having the desired specificity are subcloned by the limiting dilution technique and grown *in vitro* in culture medium. The trioma cell lines obtained are then tested for the ability to bind L-selectin or a fragment thereof.

Although triomas are genetically stable they do not produce antibodies at very high levels. Expression levels can be increased by cloning antibody genes from the trioma into one or more expression vectors, and transforming the vector into a cell line such as the cell lines discussed *supra* for expression of recombinant or humanized immunoglobulins.

b. Transgenic Non-Human Mammals

Human antibodies against L-selectin can also be produced from non-human transgenic mammals having transgenes encoding at least a segment of the human immunoglobulin locus. Usually, the endogenous immunoglobulin locus of such transgenic mammals is functionally inactivated. Preferably, the segment of the human immunoglobulin locus includes unrearranged sequences of heavy and light chain components. Both inactivation of endogenous immunoglobulin genes and introduction of exogenous immunoglobulin genes can be achieved by targeted homologous recombination, or by introduction of YAC chromosomes. The transgenic mammals resulting from this process are capable of functionally rearranging the immunoglobulin component sequences, and expressing a repertoire of antibodies of various isotypes encoded by human immunoglobulin genes, without expressing endogenous immunoglobulin genes. The production and properties of mammals having these properties are described in detail by, e.g., Lonberg et al., WO93/12227 (1993); Kucherlapati, WO 91/10741 (1991) (each of which is incorporated by reference in its entirety for all purposes). Transgenic mice are particularly suitable. Anti-L-selectin antibodies are obtained by immunizing a transgenic nonhuman

mammal, such as described by Lonberg or Kucherlapati, *supra*, with L-selectin or a fragment thereof. Monoclonal antibodies are prepared by, e.g., fusing B-cells from such mammals to suitable myeloma cell lines using conventional Kohler-Milstein technology.

c. Phage Display Methods

A further approach for obtaining human anti-L-selectin antibodies is to screen a DNA library from human B cells according to the general protocol outlined by Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989). Antibodies binding to L-selectin or a fragment thereof are selected. Sequences encoding such antibodies (or a binding fragments) are then cloned and amplified. The protocol described by Huse is rendered more efficient in combination with phage-display technology. See, e.g., Dower et al., WO 91/17271 and McCafferty et al., WO 92/01047 (each of which is incorporated by reference in its entirety for all purposes). In these methods, libraries of phage are produced in which members display different antibodies on their outersurfaces. Antibodies are usually displayed as Fv or Fab fragments. Phage displaying antibodies with a desired specificity are selected by affinity enrichment to an L-selectin polypeptide or fragment thereof.

In a variation of the phage-display method, human antibodies having the binding specificity of a selected murine antibody can be produced. See Winter, WO 92/20791. In this method, either the heavy or light chain variable region of the selected murine antibody (e.g., mouse DREG-200) is used as a starting material. If, for example, a light chain variable region is selected as the starting material, a phage library is constructed in which members displays the same light chain variable region (i.e., the murine starting material) and a different heavy chain variable region. The heavy chain variable regions are obtained from a library of rearranged human heavy chain variable regions. A phage showing strong specific binding for L-selectin (e.g., at least 10^8 and preferably at least 10^9 M^{-1}) is selected. The human heavy chain variable region from this phage then serves

as a starting material for constructing a further phage library. In this library, each phage displays the same heavy chain variable region (i.e., the region identified from the first display library) and a different light chain variable region. The light chain variable regions are obtained from a library of rearranged human variable light chain regions. Again, phage showing strong specific binding for L-selectin are selected. These phage display the variable regions of completely human anti-L-selectin antibodies. These antibodies usually have the same or similar epitope specificity as the murine starting material (e.g., mouse DREG-200).

Methods of Use

The antibodies of the present invention will typically find use in the treatment of disease conditions with an inflammatory component, especially those which are mediated by neutrophils or T cells. A preferred application is the therapeutic and prophylactic treatment of ischemia-reperfusion injury caused by myocardial infarction, cerebral ischemic event (e.g., stroke), renal, hepatic or splenic infarction, brain surgery, shock, cardiac surgery (e.g., coronary artery bypass), elective angioplasty, and the like. Other preferred applications are the treatment of sepsis, adult respiratory distress syndrome, and multiple organ failure. The antibodies will find use in treating injury due to trauma, burns, frostbite or damage to the spinal cord. They will also find use in treating autoimmune diseases including by way of example and not limitation, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, type I diabetes and uveitis, in treating inflammatory diseases of the skin such as psoriasis, and in treating meningitis and encephalitis. Other typical applications are the prevention and treatment of organ transplant rejection and graft-versus-host disease.

Any immunoglobulin of the present invention may also be used in combination with other antibodies, particularly humanized or human antibodies reactive with

different adhesion molecules. For example, suitable immunoglobulins include those specific for CD11a, CD11b, CD18, E-selectin, P-selectin and ICAM-1. Other suitable antibodies are those specific for lymphokines, such as IL-1, IL-2 and IFN- γ , and their receptors.

The antibodies of the invention can also be used as separately administered compositions given in conjunction with chemotherapeutic agents. Typically, the agents may include non-steroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids, but numerous additional agents (e.g., cyclosporin) well-known to those skilled in the art of medicine may also be utilized. Indeed, the immunoglobins of the present invention will typically be used in combination with drugs currently used by those skilled in the art to treat particular diseases.

In some therapeutic methods, for example, anti-L-selectin antibodies are used in combination with thrombolytic agents. In previous methods, patients with acute myocardial infarction are often treated by opening the occluded coronary artery. Reopening of the obstructed coronary artery can be achieved by administration of thrombolytic agents which lyse the clot causing the obstruction, and which, thereby, restore coronary blood flow. Reperfusion of the vessel can also be achieved by acute percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) by means of balloon dilation of the obstructed and narrowed segment of the coronary artery. However, restoration of coronary blood flow leads to ischemia-reperfusion injury in prior methods.

In the present methods, ischemia-reperfusion injury is reduced or prevented by combination of a thrombolytic agent or of PTCA with humanized or human anti-L-selectin antibodies. Antibodies are usually administered prophylactically before, or at the same time as, administration of thrombolytic agents or initiation of PTCA. Further doses of antibody are then often administered during and after thrombolytic or angioplastic treatment. The interval between prophylactic administration of the antibodies and initiation of thrombolytic or angioplastic

treatment is usually 5 - 30 mins, preferably 5 - 20 min, and most preferably 5 - 10 min. The antibodies are administered parentally, preferably by intravenous injection, in doses of 0.01 - 10 mg/kg body weight, preferably of 0.14 - 5 mg/kg and most preferably of 0.3 - 3 mg/kg. The antibodies can be given as an intravenous bolus injection, e.g., over 1 - 5 min., as repeated injections of smaller doses, or as an intravenous infusion. The bolus injection is especially useful for the prophylactic dose or in an emergency. Further doses of antibodies can be repeated (e.g., every 4 - 6 h) during and after thrombolytic or angioplastic treatment of acute myocardial infarction at the same proportions as described above to achieve optimal plasma levels of the antibody.

Thrombolytic agents are drugs having the capacity, directly or indirectly, to stimulate dissolution of thrombi *in vivo*. Thrombolytic agents include tissue plasminogen activator (see EP-B 0 093 619), activase, alteplase, duteplase, silteplase, streptokinase, anistreplase, urokinase, heparin, warfarin and coumarin. Additional thrombolytic agents include saruplase and vampire bat plasminogen activator. See Harris, *Protein Engineering* 6:449-458 (1987); PCT/EP 90/00194; US Patent 4,970,159). Thrombolytic agents are administered to a patient in an amount sufficient to partially disperse, or prevent the formation of, thrombi and their complications. An amount adequate to accomplish this is defined as a "therapeutically effective dose" or "efficacious dose." Amounts effective for this use will depend upon the severity of the condition, the general state of the patient, the route of administration and combination with other drugs. Often, therapeutically effective doses of thrombolytic agents and administration regimens for such agents are those approved by the FDA, for independent uses of thrombolytic agents, e.g., 100 mg of alteplase or 1.5 million IU of streptokinase.

A preferred pharmaceutical composition of the present invention comprises the use of the subject immunoglobulins in immunotoxins to kill L-selectin expressing

cells. Immunotoxins are characterized by two components and are particularly useful for killing selected cells *in vitro* or *in vivo*. One component is a cytotoxic agent which is usually fatal to a cell when attached or absorbed. The
5 second component, known as the "delivery vehicle," provides a means for delivering the toxic agent to a particular cell type, such as cells expressing a L-selectin epitope. The two components are commonly chemically bonded together by any of a variety of well-known chemical procedures. For example,
10 when the cytotoxic agent is a protein and the second component is an intact immunoglobulin, the linkage may be by way of heterobifunctional cross-linkers, e.g., SPDP, carbodiimide, glutaraldehyde, or the like. Production of various immunotoxins is well-known with the art, and can be
15 found, for example in "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet," Thorpe et al., *Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, Academic Press, pp. 168-190 (1982), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes. The components may also be linked
20 genetically (see Chaudhary et al., *Nature* 339:394 (1989), incorporated herein by reference in its entirety for all purposes).

A variety of cytotoxic agents are suitable for use in immunotoxins. Cytotoxic agents can include
25 radionuclides, such as Iodine-131 or other isotopes of iodine, Yttrium-90, Rhenium-188, and Bismuth-212 or other alpha emitters; a number of chemotherapeutic drugs, such as vindesine, methotrexate, adriamycin, and cisplatin; and cytotoxic proteins such as ribosomal inhibiting proteins like
30 pokeweed antiviral protein, *Pseudomonas* exotoxin A, ricin, diphtheria toxin, ricin A chain, etc., or an agent active at the cell surface, such as the phospholipase enzymes (e.g., phospholipase C). (See, generally, commonly assigned U.S.S.N. 07/290,968, "Chimeric Toxins," Olsnes and Phil,
35 *Pharmac. Ther.*, 25:355-381 (1982), and *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy* (eds. Baldwin and Byers, Academic Press, 1985), pp. 159-179, 224-266, all of which are

incorporated herein by reference in their entirety for all purposes.)

The delivery component of the immunotoxin will include the immunoglobulins of the present invention. Intact immunoglobulins or their binding fragments, such as Fab or Fv, are preferably used. Typically, the antibodies in the immunotoxins will be of the human IgM or IgG isotype, but other mammalian constant regions may be utilized as desired.

The antibodies and pharmaceutical compositions thereof of this invention are particularly useful for parenteral administration, i.e., subcutaneously, intramuscularly or intravenously. The antibodies of the invention may also be administered, typically for local application, by gavage or lavage, intraperitoneal injection, ophthalmic ointment, topical ointment, intracranial injection (typically into a brain ventricle), intrapericardiac injection, or intrabursal injection. The compositions for parenteral administration will commonly comprise a solution of the immunoglobulin or a cocktail thereof dissolved in an acceptable carrier, preferably an aqueous carrier. A variety of aqueous carriers can be used, e.g., water, buffered water, phosphate buffered saline (PBS), 0.4% saline, 0.3% glycine, human albumin solution and the like. These solutions are sterile and generally free of particulate matter. These compositions may be sterilized by conventional, well-known sterilization techniques. The compositions may contain pharmaceutically acceptable auxiliary substances as required to approximate physiological conditions such as pH adjusting and buffering agents, toxicity adjusting agents and the like, for example sodium acetate, sodium chloride, potassium chloride, calcium chloride and sodium lactate. The concentration of antibody in these formulations can vary widely, i.e., from less than about 0.005%, usually at least about 1% to as much as 15 or 20% by weight and will be selected primarily based on fluid volumes, viscosities, etc., in accordance with the particular mode of administration selected.

Thus, a typical pharmaceutical composition for injection could be made up to contain 1 ml sterile buffered water, and 1-70 mg of immunoglobulin. A typical composition for intravenous infusion could be made up to contain 250 ml of sterile Ringer's solution, and 150 mg of antibody. Actual methods for preparing parenterally administrable compositions will be known or apparent to those skilled in the art and are described in more detail in, for example, *Remington's Pharmaceutical Science* (15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 1980), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes. Compositions suitable for lavage or other routes will be selected according to the particular use intended. Some pharmaceutical compositions comprise both anti-L-selectin antibodies and thrombolytic agents.

The antibodies of this invention can be frozen or lyophilized for storage and reconstituted in a suitable carrier prior to use. This technique has been shown to be effective with conventional immune globulins and art-known lyophilization and reconstitution techniques can be employed. It will be appreciated by those skilled in the art that lyophilization and reconstitution can lead to varying degrees of antibody activity loss (e.g., with conventional immune globulins, IgM antibodies tend to have greater activity loss than IgG antibodies) and that use levels may have to be adjusted to compensate.

The compositions containing the present antibodies or a cocktail thereof can be administered for prophylactic and/or therapeutic treatments. In therapeutic applications, compositions are administered to a patient already suffering from an inflammatory disease, in an amount sufficient to cure or at least partially arrest the disease and its complications. An amount adequate to accomplish this is defined as a "therapeutically effective dose." Amounts effective for this use will depend upon the severity of the disease and the general state of the patient's own immune system, but generally range from about 1 to about 200 mg of antibody per dose, with dosages of from 5 to 70 mg per patient being more

commonly used. Dosing schedules will vary with the disease state and status of the patient, and will typically range from a single bolus dosage or continuous infusion to multiple administrations per day (e.g., every 4-6 hours), or as indicated by the treating physician and the patient's condition. It must be kept in mind that the materials of this invention may generally be employed in serious disease states, that is life-threatening or potentially life-threatening situations. In such cases, in view of the minimization of extraneous substances and the lower probability of "foreign substance" rejections which are achieved by the immunoglobulins of this invention, it is possible and may be felt desirable by the treating physician to administer substantial excesses of these antibodies.

In prophylactic applications, compositions containing the present antibodies or a cocktail thereof are administered to a patient not already suffering from a particular disease to enhance the patient's resistance. Such an amount is defined to be a "prophylactically effective dose." In this use, the precise amounts again depend upon the patient's state of health and general level of immunity, but generally range from 1 to 70 mg per dose. Preferred prophylactic uses are for the prevention of adult respiratory distress syndrome in patients already suffering from sepsis or trauma; prevention of organ transplant rejection; and prevention of reperfusion injury in patients suffering from ischemia. In seriously ill patients, dosages of about 50 to 150 mg of humanized or human immunoglobulin per administration are frequently used, and larger dosages may be indicated.

Single or multiple administrations of the compositions can be carried out with dose levels and pattern being selected by the treating physician. In any event, the pharmaceutical formulations should provide a quantity of the antibody(ies) of this invention sufficient to effectively treat the patient.

Antibodies of the present invention can further find a wide variety of utilities *in vitro*. By way of

example, the antibodies can be utilized for detection of L-selectin antigens, for isolating specific leukocytes, or the like. For example, but not for limitation, a humanized DREG-200 immunoglobulin can be immobilized and contacted with blood extravasated from a patient to remove blood cells bearing L-selectin antigens, and the remaining blood, depleted of L-selectin-bearing cells, may be reintroduced into the patient. Any residual humanized antibody present in the depleted blood reintroduced into the patient (e.g., as a consequence of detachment from the immobilization support) would have reduced or negligible antigenicity as compared to a murine antibody.

For diagnostic purposes, the antibodies may either be labeled or unlabeled. Unlabeled antibodies can be used in combination with other labeled antibodies (second antibodies) that are reactive with the humanized or human antibody, such as antibodies specific for human immunoglobulin constant regions. Alternatively, the antibodies can be directly labeled. A wide variety of labels may be employed, such as radionuclides, fluors, enzymes, enzyme substrates, enzyme co-factors, enzyme inhibitors, ligands (particularly haptens), etc. Numerous types of immunoassays are available and are well known to those skilled in the art.

The following examples are offered by way of illustration, not by limitation. It will be understood that although the examples pertain to the mouse DREG-200 antibody, producing humanized antibodies with high binding affinity for L-selectin may also be performed using CDRs from mouse DREG-55, mouse DREG-56, or other monoclonal antibodies that bind to an epitope of L-selectin.

EXAMPLES

Example 1: Cloning of Heavy Chain and Light Chain cDNA.

cDNAs for the heavy chain and light chain variable domain genes of mouse DREG-200 were cloned using anchored polymerase chain reactions as described (see Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992) and commonly assigned U.S.S.N. 07/634,278), using 3' primers that hybridized to the constant regions and contained HindIII sites, and 5' primers that

hybridized to the dG tails and contained EcoRI sites. The PCR amplified fragments were digested with EcoRI and HindIII and cloned into the pUC18 vector for sequencing. For mouse DREG-200, at least two gamma-1 specific and two kappa specific clones were sequenced. The gamma-1 clones and the kappa clones are respectively identical in sequence. The cDNA variable domain sequences and the deduced amino acid sequences are shown in Fig. 1.

10 Example 2: Computer Modeling of Humanized Antibodies.

 In order to retain high binding affinity in the humanized antibodies, the general procedures of Queen et al. were followed (see Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029 (1989) and WO 90/07861, which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes). The more homologous an acceptor human antibody is to the original murine donor antibody, the less likely will combining the murine CDRs with the human framework be to introduce distortions into the CDRs that could reduce affinity. Homology (that is, percent sequence identity) of at least 65% between the humanized immunoglobulin heavy chain variable region framework and the donor immunoglobulin heavy chain variable region framework is preferred. Normally the heavy chain and light chain from the same human antibody are chosen to provide the framework sequences, so as to reduce the possibility of incompatibility in the assembling of the two chains. Based on sequence homology search against the NBRF protein sequence database (performed with the MicroGenie Sequence Analysis Software (Beckman)), the antibody Eu was chosen to provide the framework sequences for humanization of mouse DREG-200.

 The computer program ENCAD (Levitt, *J. Mol. Biol.* 168:595 (1983), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes) was used to construct a model of the mouse DREG-200 variable region. The model was used to determine the amino acids in the mouse DREG-200 framework that were close enough to the CDRs to potentially interact with them (category 4 below). To design the humanized light

and heavy chain DREG-200 variable regions, at each position the amino acid was chosen to be the same as in the Eu antibody, unless that position fell in one or more of five categories:

- 5 (1) The position fell within a CDR,
- (2) The Eu amino acid was unusual for human antibodies at that position, whereas the mouse DREG-200 amino acid was typical for human antibodies at that position,
- 10 (3) The position was immediately adjacent to a CDR,
- (4) The model described above suggested that the amino acid may be physically close to the antigen binding region (CDRs).
- 15 For positions in these categories, the amino acid from the mouse DREG-200 antibody was used.
- In addition, a position was in the fifth category if
- (5) The Eu amino acid was highly unusual for human antibodies at that position, and the mouse DREG-200 amino acid was different but also unusual. Then an amino acid typical for human antibodies at that position was used.
- 20

25 The amino acids in each category are shown in Table 1. Some amino acids may be in more than one category. The final sequences of the humanized DREG-200 light and heavy chain variable domains are shown in Fig. 2, compared with the murine DREG-200 sequences.

TABLE 1

	<u>Category</u>	<u>Light Chain</u>	<u>Heavy Chain</u>
5	1	24-40, 56-62, 95-103	31-35, 50-66, 99-110
	2	87	93, 95, 98, 111, 112, 115
10	3	--	30, 98, 111
	4	54, 66, 76, 93	27, 30, 48, 72
15	5	--	113

For the construction of genes for the humanized antibodies, nucleotide sequences were selected that encode the protein sequences of the humanized heavy and light chains, including signal peptides, generally utilizing codons found in the mouse sequence. Several degenerate codons were changed to create restriction sites or to remove undesirable ones. The nucleotide sequences of the genes also included splice donor signals and an XbaI site at each end. The nucleotide sequences and encoded humanized light and heavy chain variable domains are shown in Fig. 3. Each gene was constructed from four overlapping synthetic oligonucleotides, as described (see Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992), and commonly assigned U.S.S.N. 07/634,278, which are incorporated herein by reference in their entirety for all purposes.) The heavy and light chain variable region genes were then respectively ligated into the XbaI sites of the pVg1-dhfr or pVk expression vectors (see commonly assigned U.S.S.N 07/634,278) in the appropriate orientations to produce the complete heavy and light chain genes. Reactions were carried out under conditions well-known in the art (Maniatis et al., *supra*)

The heavy chain and light chain plasmids were transfected into Sp2/0 mouse myeloma cells by electroporation and cells were selected for gpt expression. Clones were screened by assaying human antibody production in the culture supernatant by ELISA, and antibody was purified from the best-producing clones. Humanized DREG-200 IgG1 antibody was then purified by passing tissue culture supernatant over a column

of staphylococcal protein A-Sepharose CL-4B (Pharmacia). The bound antibody was eluted with 0.2 M Glycine-HCl, pH3.0 and neutralized with 1 M Tris PH8.0. The buffer was exchanged into PBS by passing over a PD10 column (Pharmacia), or by
5 dialysis. To obtain cells producing higher levels of antibody, the transfected clones may be cultured in increasing concentrations of methotrexate.

To produce a humanized DREG-200 antibody of the IgG4 isotype, another vector pVg4-dhfr was first constructed. To
10 do so, the XbaI-BamHI fragment of pVg1-dhfr containing the $\gamma 1$ constant region was replaced with an approximately 2000 bp fragment of the human $\gamma 4$ constant region gene (Ellison and Hood, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:1984 (1982)) that extended
15 from the HindIII site preceding the C_H1 exon of the $\gamma 4$ gene to 270 bp after the NsiI site following the C_H4 exon of the gene, using methods well-known to those skilled in the art, including polymerase chain reaction. The humanized DREG-200 heavy chain variable region gene was then cloned into the XbaI
20 site of pVg4-dhfr. This heavy chain plasmid was then transfected together with the above light chain plasmid into Sp2/0 cells, clones selected, and humanized DREG-200 IgG4 antibody purified as described above for the IgG1 antibody.

Example 3: Properties of Humanized Antibodies.

25 The affinity of the humanized DREG-200 antibodies for L-selectin were determined by competition with the radio-iodinated mouse DREG-200 antibody (Fig. 4). The binding affinities were calculated according to the methods of Berzofsky (J.A. Berzofsky and I.J. Berkower, in *Fundamental*
30 *Immunology* (ed. W.E. Paul), Raven Press (New York), 595 (1984), which is incorporated herein by reference in its entirety for all purposes). The humanized DREG-200 antibodies had an affinity within about 2-fold of the mouse DREG-200 antibody. A similar result will be found when the affinity
35 for L-selectin on human neutrophils is measured.

The ability of the mouse and humanized DREG-200 antibodies to block the adhesion of human neutrophils to endothelial cells was determined using a modification of the

assay method of Hallmann et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 174:236 (1991). Specifically, human umbilical cord endothelial cells (HUVEC; from Clonetics, San Diego) were grown to confluence in EGM medium (Clonetics) in Lab-Tek 8-chamber slides (Nunc, Naperville, IL). The HUVEC cells were stimulated with 20 ng/ml IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, MN) for 4 hr before use. Neutrophils were isolated by density gradient centrifugation from buffy coats that had been cleared of erythrocytes by dextran sedimentation, and then adjusted to 10⁷ per ml. The neutrophils (100 μ l) were pre-incubated for 20 minutes on ice with varying concentrations of antibody (in 100 μ l RPMI). The HUVEC slides were washed free of IL-1 β and placed on a rotary shaker (100 rpm) at 4°C. The untreated or antibody treated neutrophils were added to the chambers, and the slide was incubated at 4°C on the shaker for 30 min. The slides were then washed by dipping ten times into a beaker of RPMI, fixed in 1% glutaraldehyde in RPMI, and allowed to air dry. Neutrophil adherence was quantified by counting the neutrophils attached to a defined area of the endothelial cell monolayer with a microscope. As shown in Fig. 5, the humanized IgG1 and mouse DREG-200 antibodies both effectively blocked the binding of neutrophils to the HUVEC, while an irrelevant control antibody did not. The humanized DREG-200 IgG4 antibody will similarly block binding of neutrophils to endothelial cells.

Example 4: Effect of hu DREG-200 on Myocardial Injury Following Reperfusion.

The effect of humanized DREG-200 of the IgG4 isotype (hu DREG-200) on the degree of actual salvage of myocardial ischemic tissue following reperfusion was investigated. Adult male cats (2.8-4.2 kg) were anesthetized with sodium pentobarbital (30 mg/kg, i.v.). An intratracheal cannula was inserted through a midline incision, and the cats were placed on intermittent positive-pressure ventilation (Harvard small animal respirator, Dover, MA). A polyethylene catheter was inserted into the right external jugular vein for additional pentobarbital infusion in order to maintain a surgical plane

of anesthesia and for administration of antibodies. Another polyethylene catheter was inserted through the left femoral artery and positioned in the abdominal aorta for the measurement of mean arterial blood pressure (MABP) via a pressure transducer (Cobe Instruments, Lakewood, CO). After a midsternal thoracotomy, the anterior pericardium was incised, and a 3-0 silk suture was placed around the left anterior descending (LAD) coronary artery 8 to 10 mm from its origin. A high-fidelity catheter tip pressure transducer (Model MPC 500, with transducer control unit - Model TCB 500, Millar Instruments Inc., Houston, TX) was introduced into the left ventricle through the apical dimple. The catheter was positioned via observation of the LV pressure and dp/dt wave forms and then secured in place by a silk suture. Standard lead II of the scalar electrocardiogram (ECG) was used to determine heart rate (HR) and ST-segment elevation. ST-segment elevations were determined by analysis of the ECG recording at 50 mm/sec every 20 min. The ECG, MABP, LVP and dp/dt were continuously monitored on a Hewlett-Packard 78304 A unit (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) and recorded on a Gould oscillographic recorder (Gould Inc., Cleveland, OH) every 20 min. The pressure-rate index (PRI), an approximation of myocardial oxygen demand, was calculated as the product of MABP and HR divided by 1000.

After completing all surgical procedures, the cats were allowed to stabilize for 30 minutes, at which time baseline readings of ECG, MABP, LVP and dp/dt were recorded. Myocardial ischemia (MI) was induced by tightening the initially placed reversible ligature around the LAD so that the vessel was completely occluded. This was designated as time point zero. 2 mg/kg body weight of hu DREG-200 (IgG4 isotype) or a control MAb hu ABL-364 (i.e., isotype-matched humanized control IgG4 MAb) was given intravenously as a bolus 80 min after coronary occlusion (i.e., 10 min prior to reperfusion, R). 10 min later (i.e., after a total of 90 min ischemia, I) the LAD ligature was untied and the ischemic myocardium was reperfused for 4.5 h.

The cats were randomly divided into three major groups. Six sham MI + R cats received hu DREG-200 (2 mg/kg), six MI + R cats received the control MAb hu ABL-364 (2 mg/kg), and six MI + R cats received hu DREG-200 (2 mg/kg). Sham MI + R cats were subjected to the same surgical procedures as MI + R cats except that the LAD coronary artery was not occluded.

At the end of the 4.5 h reperfusion period, the ligature around the LAD was again tightened. 20 ml of 0.5% Evans blue was rapidly injected into the left ventricle to stain the area of myocardium which was perfused by the patent coronary arteries. The area-at-risk was determined by negative staining. Immediately following this injection, the heart was rapidly excised and placed in warmed, oxygenated K-H solution. The left circumflex (LCX) and the LAD coronary arteries were isolated and removed for subsequent study of coronary ring vasoactivity and PMN adherence. The right ventricle, great vessels, and fat tissue were carefully removed, and the left ventricle was sliced parallel to the atrioventricular groove in 3 mm thick sections. The unstained portion of the myocardium (i.e., the total area-at-risk or ischemic area) was separated from the Evans blue stained portion of the myocardium (i.e., the area-not-at-risk or nonischemic area). The area-at-risk was sectioned into small cubes and incubated in 0.1% nitroblue tetrazolium in phosphate solution at pH 7.4 and 37°C for 15 min. The tetrazolium dye forms a blue formazan complex in the presence of myocardial cells containing active dehydrogenases and their cofactors. The irreversibly injured or necrotic portion of the myocardium-at-risk, which did not stain, was separated from the stained portion of the myocardium (i.e., the ischemic but non-necrotic area). The three portions of the myocardium (i.e., non-ischemic, ischemic non-necrotic, and ischemic necrotic tissue) were subsequently weighed. Results were expressed as necrotic cardiac tissue area as a percentage of either the area-at-risk or of total left ventricular mass.

According to both of these criteria, cardiac tissue damage was significantly attenuated ($p < 0.001$) in cats treated with hu DREG-200. Whereas about 30% of the

jeopardized myocardium developed into necrotic tissue in the group treated with the control antibody, the amount of necrotic tissue was less than 15% ($p < 0.01$) in the hu DREG-200 treated group, a decrease of 50-60%. See Fig. 6. There was no significant difference in the wet weights of the areas-at-risk expressed as a percentage of total left ventricle between the two ischemic groups, indicating that a comparable area of myocardial ischemia occurred in both groups. Therefore, hu DREG-200 significantly protects against reperfusion injury.

The remarkable preservation of ischemic tissue by hu DREG-200 is further illustrated from measurements of plasma creatine kinase activity, a biochemical marker of myocardial injury. Arterial blood samples (2 ml) were drawn immediately before ligation and hourly thereafter. The blood was collected in polyethylene tubes containing 200 IU of heparin sodium. Samples were centrifuged at 2000 x g and 4°C for 20 min and the plasma was decanted for biochemical analysis. Plasma protein concentration was assayed using the biuret method of Gornall et al., *J. Biol. Chem.* 177:751-766 (1949). Plasma creatine kinase (CK) activity was measured using the method of Rosalki, *J. Lab. Clin Med.* 69:696-705 (1967), and expressed as IU/ μ g protein.

In sham MI/R cats receiving hu DREG-200, the plasma CK activity increased slightly throughout the 6 hour observation period reaching a final value of 3.8 ± 0.9 IU/ μ g protein. In the two ischemic groups, plasma CK activity increased slightly during the period of myocardial ischemia. In cats receiving hu ABL-364, CK activity in circulating blood increased markedly within the first 30 min follow reperfusion and further increased during the remaining four hours of reperfusion. By contrast, ischemic cats treated with hu DREG-200 developed significantly lower plasma CK activities compared with ischemic cats receiving the hu ABL-364 ($p < 0.05$). The effect was sustained over the entire reperfusion period, further evidencing the substantial protection conferred by hu DREG-200 against myocardial reperfusion injury.

Example 5: Effect of hu DREG-200 on Cardiac Function.

The effect of hu DREG-200 (IgG4 isotype) on cardiac function was determined by measurement of left ventricular pressure (LVP), and the first derivative of LVP, dp/dt max, an index of myocardial contractility. Data were obtained from a catheter tip manometer inserted in the left ventricular cavity. The three groups of cats discussed in the previous example all showed comparable initial values for these cardiac variables. In the sham MI group there were no significant changes in dp/dt max over the entire six hour experimental period. However, in both MI/R groups, dp/dt max decreased upon occlusion of the LAD to about 65%. In cats given hu ABL-364, contractility did not significantly recover. However, in hu DREG-200 treated MI-R cats, dp/dt max recovered to control values three hours following reperfusion. Hence, after 4.5 hours of reperfusion, dp/dt max was significantly lower in hu ABL-364 treated cats than in hu DREG-200 treated cats ($p < 0.01$). These results indicate that hu DREG-200 not only reduced myocardial necrosis following reperfusion of the ischemic myocardium, but this myocardial salvage was also translated into an improvement in mechanical performance of the heart.

From the foregoing, it will be appreciated that the immunoglobulins of the present invention offer numerous advantages over other L-selectin specific antibodies. In comparison to mouse monoclonal antibodies, the present immunoglobulins can be more economically produced and contain substantially less foreign amino acid sequences. This reduced likelihood of antigenicity after injection into a human patient represents a significant therapeutic improvement.

All publications and patent applications cited above are herein incorporated by reference in their entirety for all purposes to the same extent as if each individual publication or patent application were specifically and individually indicated to be so incorporated by reference. Although the present invention has been described in some detail by way of illustration and example for purposes of clarity and

understanding, it will be apparent that certain changes and modifications may be practiced within the scope of the appended claims.

WE CLAIM:

1. A humanized immunoglobulin having complementarity determining regions (CDRs) corresponding to CDRs from a donor immunoglobulin and heavy and light chain variable region frameworks corresponding to human acceptor immunoglobulin heavy and light chain frameworks, which humanized immunoglobulin specifically binds to human L-selectin with an affinity constant of at least 10^7 M^{-1} , wherein the sequence of the humanized immunoglobulin heavy chain variable region framework is 65% or more identical to the sequence of the donor immunoglobulin heavy chain variable region framework.
2. A humanized immunoglobulin according to claim 1 which is an antibody comprising two light chain/heavy chain dimers.
3. A humanized immunoglobulin of claim 2, wherein said antibody is of the IgG1 or IgG4 isotype.
4. A humanized immunoglobulin according to claim 1, which specifically binds to human L-selectin with an affinity of at least 10^8 M^{-1} .
5. A humanized immunoglobulin according to claim 1, wherein said donor immunoglobulin is the mouse DREG-200 antibody.
6. A humanized immunoglobulin according to claim 1, wherein said acceptor immunoglobulin heavy and light chain frameworks are from the same human antibody.
7. A humanized immunoglobulin according to claim 6, wherein said human antibody is the Eu human antibody.

8. A humanized immunoglobulin having complementarity determining regions (CDRs) corresponding to CDRs from a donor immunoglobulin and heavy and light chain variable region frameworks corresponding to acceptor immunoglobulin heavy and light chain frameworks, which humanized immunoglobulin specifically binds to human L-selectin with an affinity constant of at least 10^7 M^{-1} , wherein the sequence of the acceptor immunoglobulin heavy chain variable region is among the 5 sequences in a representative collection of sequences of human immunoglobulin heavy chain variable regions most homologous to the sequence of the donor immunoglobulin heavy chain variable region.

9. A humanized immunoglobulin having complementarity determining regions (CDRs) corresponding to CDRs from a donor immunoglobulin and heavy and light chain variable region frameworks corresponding to acceptor immunoglobulin heavy and light chain frameworks, which humanized immunoglobulin specifically binds to human L-selectin with an affinity constant of at least 10^7 M^{-1} , wherein said humanized immunoglobulin comprises amino acids from the donor immunoglobulin framework replacing the corresponding amino acids in the acceptor immunoglobulin heavy or light chain frameworks, said amino acids not in positions 26-30 of the heavy chain, and each of said amino acids:

- (i) is adjacent to a CDR in the donor immunoglobulin sequence, or
- (ii) contains an atom within a distance of 5 angstroms of a CDR in said humanized immunoglobulin.

10. A humanized immunoglobulin having complementarity determining regions (CDRs) corresponding to CDRs from a donor immunoglobulin and heavy and light chain variable region frameworks corresponding to acceptor immunoglobulin heavy and light chain frameworks, which humanized immunoglobulin specifically binds to human L-selectin with an affinity constant of at least 10^7 M^{-1} , wherein said humanized immunoglobulin comprises amino acids from the

donor immunoglobulin framework replacing the corresponding amino acids in the acceptor immunoglobulin heavy or light chain frameworks, said amino acids not in positions 26-30 of the heavy chain, and each of said amino acids:

- 5 (i) is adjacent to a CDR in the donor immunoglobulin sequence, or
 (ii) contains an atom within a distance of 4 angstroms of a CDR in said humanized immunoglobulin.

10 11. A humanized immunoglobulin according to claims 9 or 10 wherein the distance from said atom to said CDR is determined from a computer-generated model of an immunoglobulin.

15 12. A humanized immunoglobulin according to claims 9 or 10, wherein said donor immunoglobulin is the mouse DREG-200 antibody.

20 13. A humanized immunoglobulin according to claim 9 which is an antibody comprising two light chain/heavy chain dimers.

25 14. A humanized immunoglobulin of claim 13, wherein said antibody is of the IgG1 or IgG4 isotype.

 15. A humanized immunoglobulin according to claim 9, wherein said acceptor immunoglobulin heavy and light chain frameworks are both from the Eu human antibody.

30 16. A humanized immunoglobulin according to claims 1 or 9 which is substantially pure.

35 17. A humanized immunoglobulin according to claims 1 or 9 that inhibits the binding of human neutrophils to human endothelial cells.

 18. A composition comprising a humanized immunoglobulin according to claims 1 or 9.

19. A recombinant immunoglobulin which specifically binds to human L-selectin, wherein the amino acid sequence of the mature light chain variable region is as shown in the lower lines of Fig. 2A.

20. A recombinant immunoglobulin which specifically binds to human L-selectin, wherein the amino acid sequence of the mature heavy chain variable region is as shown in the lower lines of Fig. 2B.

21. A method of treating an inflammatory disease or condition, comprising administering to a human patient a therapeutically-effective dose of a humanized immunoglobulin which specifically binds to human L-selectin.

22. A method according to claim 21, wherein the inflammatory disease or condition is selected from the group consisting of: ischemia-reperfusion injury, adult respiratory distress syndrome, sepsis, and autoimmune disease.

23. A method according to claim 21, wherein the humanized immunoglobulin comprises the amino acid sequence of the mature light chain variable region as shown in the lower lines of Fig. 2A and the amino acid sequence of the mature heavy chain variable region as shown in the lower lines of Fig. 2B.

24. A method according to claim 21, wherein the humanized immunoglobulin binds to human L-selectin with an affinity of at least $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

25. A method according to claim 24, wherein at least about 10 mg of the humanized immunoglobulin is administered by a parenteral route.

26. A method according to claim 22, wherein the inflammatory disease or condition is ischemia-reperfusion injury.

27. A method according to claim 26, further comprising the step of administering a therapeutically effective dose of a thrombolytic agent.

5 28. A method according to claim 27, wherein the ischemia-reperfusion injury is due to myocardial infarction or balloon angioplasty.

10 29. A humanized immunoglobulin of claim 1 comprising a humanized heavy chain and a humanized light chain:

15 (1) the humanized light chain comprising three complementarity determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3) having amino acid sequences from the corresponding complementarity determining regions of a mouse DREG-200 immunoglobulin light chain, and having a variable region framework from a human light chain variable region framework sequence except in at least one position selected from a first group consisting of L87, L54, L66, L76 and L93, wherein said amino acid position is occupied by the same amino acid present in the equivalent position of the mouse DREG-200 immunoglobulin light chain variable region framework; and

20 (2) the humanized heavy chain comprising three complementarity determining regions (CDR1, CDR2 and CDR3) having amino acid sequences from the corresponding complementarity determining regions of a mouse DREG-200 immunoglobulin heavy chain, and having a variable region framework from a human heavy chain variable region framework sequence except in at least one position selected from a group consisting of H93, H95, H98, H111, H112, H115, H30, H98, H111, H27, H30, H48 and H72, wherein said amino acid position is occupied by the same amino acid present in the equivalent position of the mouse DREG-200 immunoglobulin heavy chain variable region framework;

35 wherein the immunoglobulin binds to a L-selectin ligand with a binding affinity that is within three-fold of the binding affinity of the mouse DREG-200 immunoglobulin.

1/6

30 60
ATGGAATCACAGACCCAGGTCCTCATGTTTCTTCTGCTCTGGGTATCTGGTGCCTGTGCA
M E S Q T Q V L M F L L L W V S G A C A
90 120
GACATTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATGTCAGTAGGACAGAAGGTCACT
D I V M T Q S P S S L A M S V G Q K V T
150 180
ATGACCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAGCAATCAAAAGAACTATTTGGCC
M T C K S S Q S L L N S S N Q K N Y L A
210 240
TGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGTCTCCTAAACTTCTGGTATACTTTGCATCCACTAGG
W Y Q Q K P G Q S P K L L V Y F A S T R
270 300
GAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACC
E S G V P D R F I G S G S G T D F T L T
330 360
ATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTACCAACATTATAGCACT
I S S V Q A E D L A D Y F C H Q H Y S T
390
CCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA
P L T F G A G T K L E L K

FIG. 1A

30 60
ATGGAATGGAGTTGGATATTTCTCTTTCTCCTGTCAGGAAGTGCAGGTGTCCACTCTGAG
M E W S W I F L F L L S G T A G V H S E
90 120
GTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGACCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCC
V Q L Q Q S G P D L V K P G A S V K M S
150 180
TGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTATGCACTGGGTGAAGCAGAAGCCT
C K A S G Y T F T S Y V M H W V K Q K P
210 240
GGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTTATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAAT
G Q G L E W I G Y I Y P Y N D G T K Y N
270 300
GAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
E K F K G K A T L T S D K S S S T A Y M
330 360
GAGCTCAGCAGCTTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGGGAGGAGTAT
E L S S L T S E D S A V Y Y C A R E E Y
390 420
GGTAACTACGTTCCGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
G N Y V R Y F D V W G A G T T V T V S S

FIG. 1B

1	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	A	M	S	V	G	Q	K	V	T
1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T
21	M	T	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A
21	I	T	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A
41	W	Y	Q	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	V	Y	F	A	S	T	R
41	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	V	Y	F	A	S	T	R
61	E	S	G	V	P	D	R	F	I	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
61	E	S	G	V	P	D	R	F	I	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T
81	I	S	S	V	Q	A	E	D	L	A	D	Y	F	C	H	Q	H	Y	S	T
81	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	F	C	H	Q	H	Y	S	T
101	P	L	T	F	G	A	G	T	K	L	E	L	K							
101	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	V	K							

FIG. 2A

1	E	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	D	L	V	K	P	G	A	S	V	K	M
1	Q	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	S	S	V	K	V
21	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	V	M	H	W	V	K	Q	K
21	S	C	K	A	S	G	Y	T	F	T	S	Y	V	M	H	W	V	R	Q	A
41	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	P	Y	N	D	G	T	K	Y
41	P	G	Q	G	L	E	W	I	G	Y	I	Y	P	Y	N	D	G	T	K	Y
61	N	E	K	F	K	G	K	A	T	L	T	S	D	K	S	S	S	T	A	Y
61	N	E	K	F	K	G	R	V	T	I	T	S	D	E	S	T	N	T	A	Y
81	M	E	L	S	S	L	T	S	E	D	S	A	V	Y	Y	C	A	R	E	E
81	M	E	L	S	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	E	E
101	Y	G	N	Y	V	R	Y	F	D	V	W	G	A	G	T	T	V	T	V	S
101	Y	G	N	Y	V	R	Y	F	D	V	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S
121	S																			
121	S																			

FIG. 2B

10 20 30 40 50 60
TCTAGACCACCATGGTTTTTCACACCTCAGATACTTGGACTTATGCTTTTTTGGATTTCAG
M V F T P Q I L G L M L F W I S

70 80 90 100 110 120
CCTCCAGAGGTGACATTCAGATGACACAGTCTCCATCCACTCTGAGTGCATCAGTAGGAG
A S R G D I Q M T Q S P S T L S A S V G

130 140 150 160 170 180
ATCGTGTCACTATTACATGTAAGAGCTCAGAGCCCTTTTAAATAGTAGCAATCAAAAGA
D R V T I T C K S S Q S L L N S S N Q K

190 200 210 220 230 240
ACTATTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGAAAGGCACCTAAGCTTCTGGTATACTTTG
N Y L A W Y Q Q K P G K A P K L L V Y F

250 260 270 280 290 300
CATCCACTAGGGAATCTGGAGTCCCTGATCGCTTCATAGGTAGTGGATCTGGTACAGATT
A S T R E S G V P D R F I G S G S G T D

310 320 330 340 350 360
TCACTCTTACCATCAGCAGTCTGCAGCCAGAAGACTTTTGAACATACTTCTGTCCACCAAC
F T L T I S S L Q P E D F A T Y F C H Q

370 380 390 400 410 420
ATTATAGCACTCCGCTCACGTTCCGGTCAAGGTACTAAGGTAGAAGTCAAGCGTAAGTACA
H Y S T P L T F G Q G T K V E V K

430
CTTTTCTAGA

FIG. 3A

10 20 30 40 50 60
TCTAGACCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTG
M G W S C I I L F L V A T A T G

70 80 90 100 110 120
TCCACTCCCAGGTCCAGCTGGTACAGTCTGGAGCTGAAGTCAAGAAACCTGGGAGCTCAG
V H S Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S

130 140 150 160 170 180
TGAAGGTATCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTAGCTATGTTATGCACTGGGTGA
V K V S C K A S G Y T F T S Y V M H W V

190 200 210 220 230 240
GACAGGCACCTGGTCAAGGACTCGAGTGGATTGGATATATTTATCCTTACAATGATGGTA
R Q A P G Q G L E W I G Y I Y P Y N D G

250 260 270 280 290 300
CCAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCCGAGTCACAATTACTTCAGACGAGTCCACTAACA
T K Y N E K F K G R V T I T S D E S T N

310 320 330 340 350 360
CAGCCTACATGGAACCTCAGCAGCTTGCATCGGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAA
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A

370 380 390 400 410 420
GGGAGGAGTATGGTAACTACGTTCCGGTACTTCGATGTCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCA
R E E Y G N Y V R Y F D V W G Q G T L V

430 440 450
CAGTCTCCTCAGGTGAGTCCTAACTTCTAGA
T V S S

FIG 3B

4/6

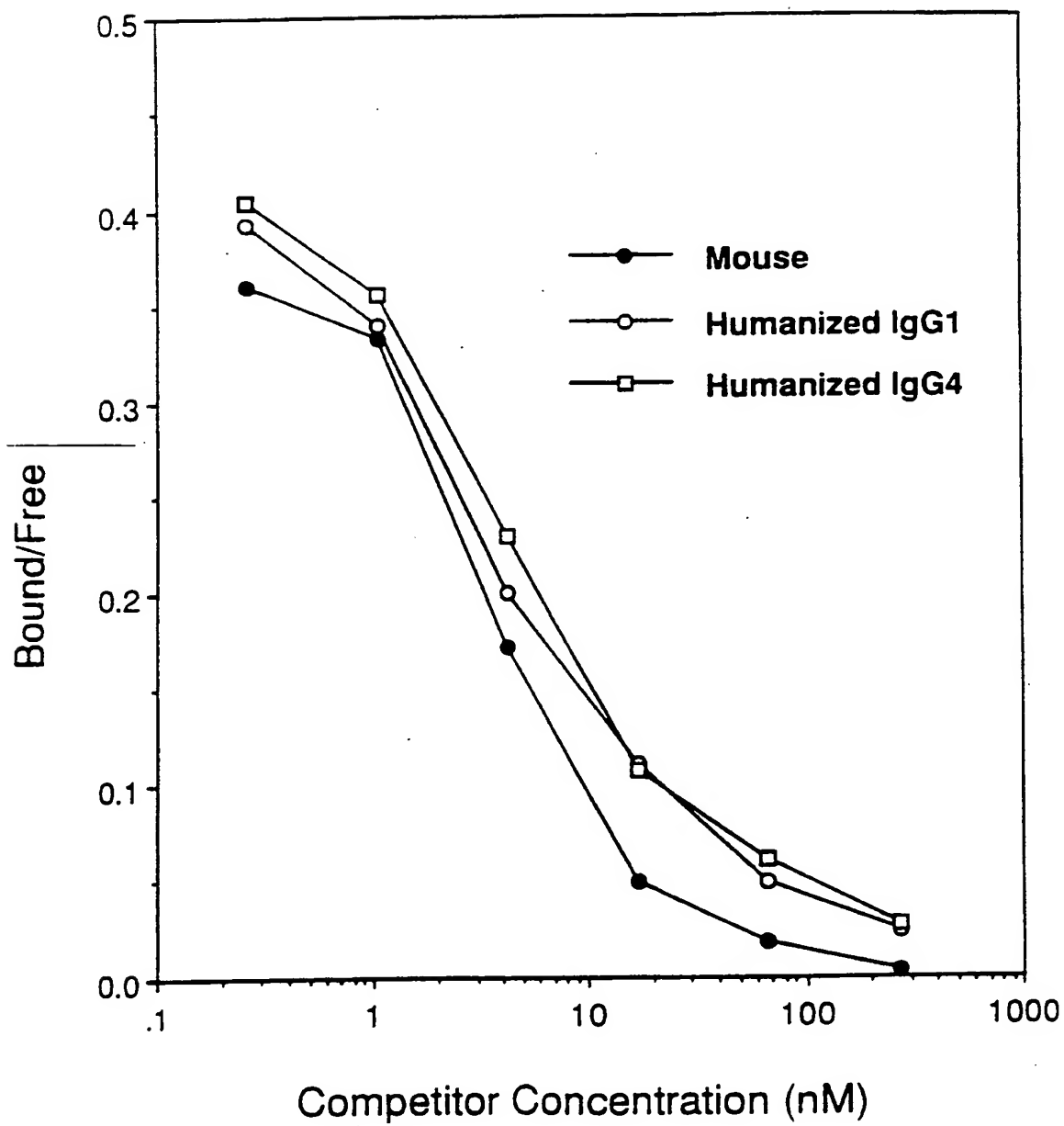


Figure 4

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

5/6

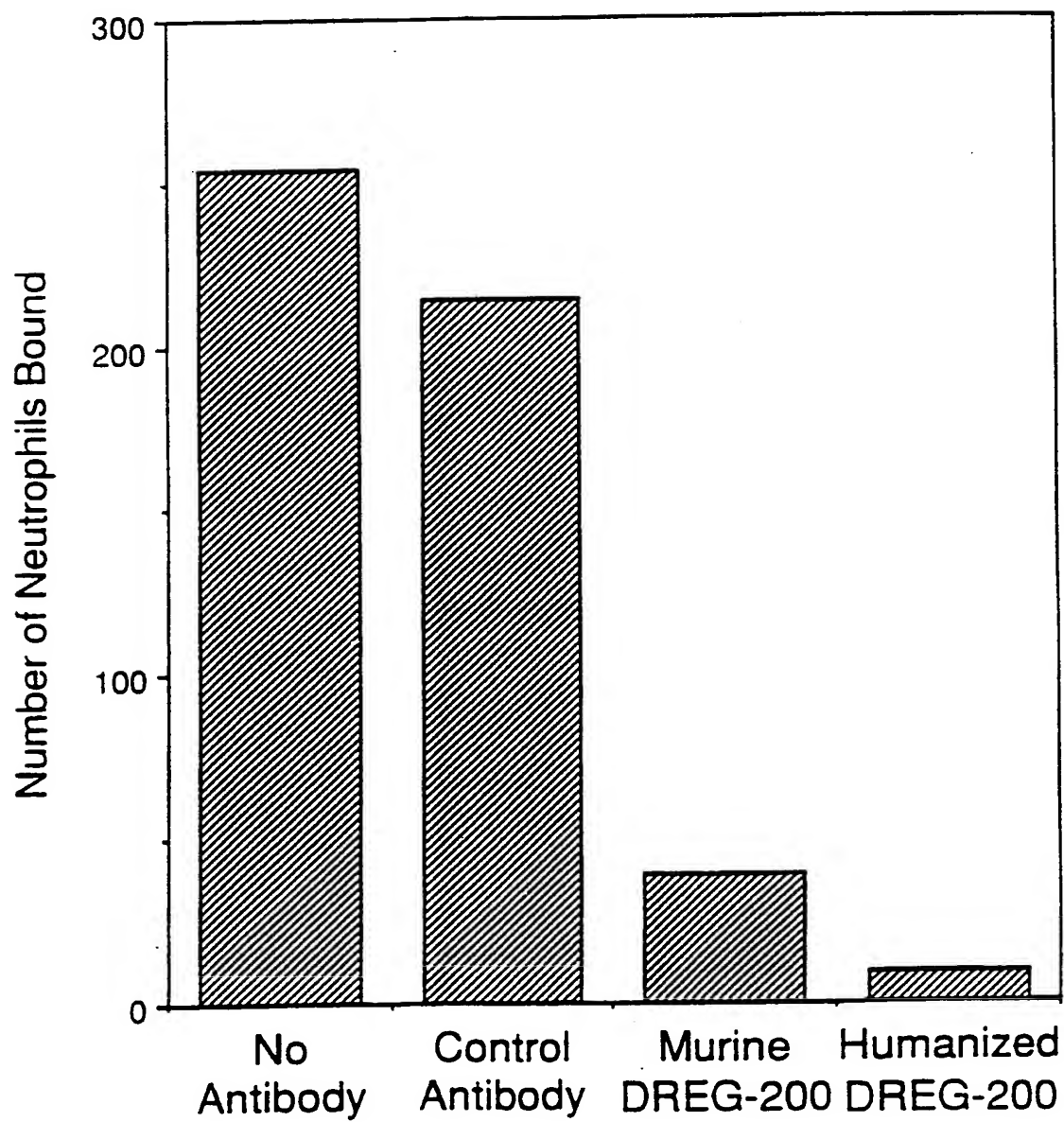


Figure 5

6/6

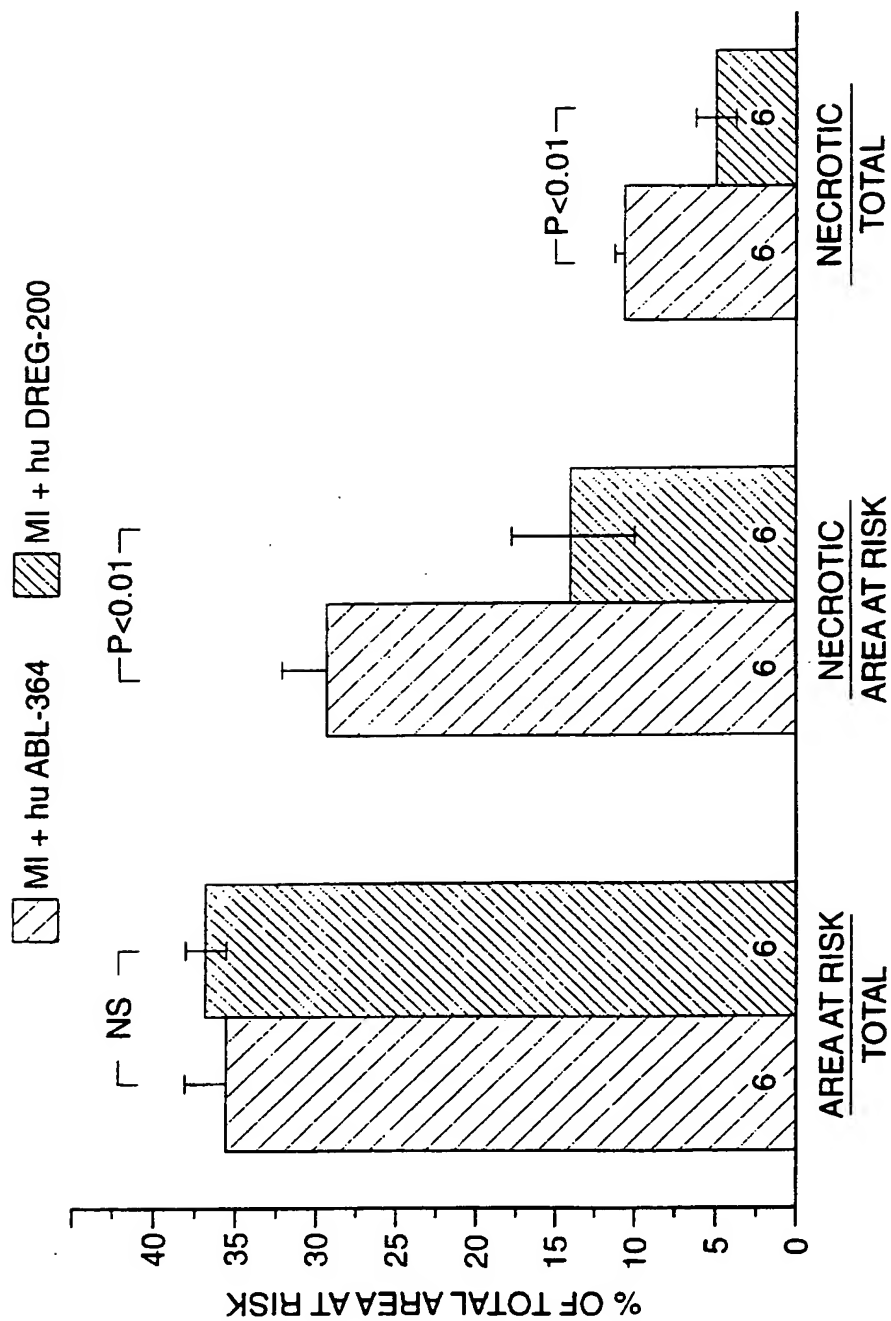


FIG. 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US93/11612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(5) :A61K 39/395; C07K 15/28; C12N 15/13; C12P 21/08

US CL :424/85.8; 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.22, 388.7

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/85.8; 530/387.1, 387.3, 388.1, 388.22, 388.7

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

APS, DIALOG, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, PI

search terms: L-selectin, LAM, chimeric, humanized, Co, Dreg-200

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y, P	TIBTECH, Volume 11, issued February 1993, W.J. Harris et al., "Therapeutic Antibodies - The Coming of Age", pages 42-45, see entire document.	1-29
Y	Proc. Natl. Acad. Sci., Volume 87, issued March 1990, T.K. Kishimoto et al., "Identification of a Human Peripheral Lymph Node Homing Receptor: A Rapidly Down-Regulated Adhesion Molecule", pages 2244-2248, see entire document.	1-29
Y	Immunol. Reviews, Volume 114, issued May 1990, T.M. Carlos et al., "Membrane Proteins Involved In Phagocyte Adherence To Endothelium", pages 5-25, see entire document.	1-29



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"G"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

13 January 1994

Date of mailing of the international search report

09 FEB 1994

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231

Facsimile No. NOT APPLICABLE

Authorized officer

PHILLIP GAMBEL

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US93/11612

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Blood, Volume 78, No. 3 issued 01 August 1991, T.K. Kishimoto et al., "Antibodies Against Human Neutrophil LECAM-1 (LAM-1/Leu-8/DREG-56 antigen) And Endothelial Cell ELAM-1 Inhibit A Common CD18-Independent Adhesion Pathway In Vitro", pages 805-811, see entire document.	1-29
Y	Proc. Natl. Acad. Sci., Volume 86, issued December 1989, C. Queen et al., "A Humanized Antibody That Binds To The Interleukin 2 Receptor", pages 10029-10033, see entire document.	1-29
Y	EP, A, 0,440,351 (Law et al.) 07 August 1991, see entire document.	1-29